

© Е.О.Богданова, О.В.Галкина, И.М. Зубина, В.А.Добронравов, 2016  
УДК [616.61-036.12:611.018.2]:546.32+576.3

*Е.О. Богданова, О.В. Галкина, И.М. Зубина, В.А. Добронравов*

## KLOTHO, ФАКТОР РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 23 И НЕОРГАНИЧЕСКИЙ ФОСФАТ НА РАННИХ СТАДИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии

*E.O. Bogdanova, O.V. Galkina, I.M. Zubina, V.A. Dobronravov*

## KLOTHO, FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 AND INORGANIC PHOSPHATE IN EARLY STAGES OF CRONIC KIDNEY DISEASE

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Institute of Nephrology

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ:** уточнить, связана ли система  $\alpha$ Klotho/FGF23 с изменениями мочевого экскреции неорганического фосфата (Pi) почками на ранних стадиях хронической болезни почек (ХБП). **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ:** в исследование включены 80 пациентов (возраст  $40,3 \pm 16,1$  года) с первичной иммунной гломерулопатией и расчетной скоростью клубочковой фильтрации (рСКФ) от 140 до 30 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ . Анализировали концентрации Pi, интактного FGF23, интактного PTH и белка  $\alpha$ Klotho (sKlotho) в крови, концентрацию  $\alpha$ Klotho в моче, стандартизованную по креатинину мочи (uKlotho/uCr). Уровень экспрессии белка  $\alpha$ Klotho в тубулоинтерстиции (rKlotho) оценивали методом морфометрии. Рассчитывали фракционную (FEPi) и суточную (uPi24) экскрецию Pi почками. **РЕЗУЛЬТАТЫ:** в группах больных с рСКФ 140–100, 99–70, 69–50 и 49–30 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  достоверных различий sPi и uPi24 выявлено не было. Уровень FEPi достоверно возрастал по мере снижения рСКФ ( $p < 0,001$ ). Экспрессия rKlotho в тубулярном эпителии была достоверно ниже при рСКФ 99–70 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ , а концентрация sKlotho – при рСКФ 69–50 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  в сравнении с рСКФ 140–100 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ . Последняя имела достоверные связи с рСКФ ( $r=0,35$ ,  $p=0,002$ ), выраженностью интерстициального фиброза ( $r=-0,43$ ,  $p=0,025$ ) и гломерулосклероза ( $r=-0,45$ ,  $p=0,015$ ). По мере снижения рСКФ было выявлено достоверное увеличение PTH, начиная с рСКФ 99–70 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  в сравнении с рСКФ 140–100 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ . Значения FGF23 были достоверно выше только в группе пациентов с рСКФ 49–30 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ . При корреляционном анализе не выявлено достоверных взаимосвязей показателей обмена Pi,  $\alpha$ Klotho и FGF23 в подгруппе больных с рСКФ  $\geq 50$  мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$ ; при рСКФ  $< 50$  мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  FGF23 коррелировал с sPi. В этих же подгруппах FEPi имела достоверную корреляционную связь с уровнем PTH. Ни  $\alpha$ Klotho, ни FGF23 не вошли в число независимых факторов, связанных с индексами мочевого экскреции Pi, при мультивариантном регрессионном анализе; sPi был независимо связан с FGF23 ( $\beta=0,50$ ;  $p=0,007$ ), а FEPi – с PTH ( $\beta=0,43$ ;  $p=0,003$ ). **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** снижение уровня  $\alpha$ Klotho в почке и циркуляции происходит на ранних стадиях ХБП, предшествует росту концентрации FGF23 и, предположительно, связано с повреждением тубулоинтерстиция. На ранних стадиях ХБП изменение тубулярной реабсорбции и почечной экскреции Pi как важного фактора поддержания нейтрального баланса данного аниона происходит независимо от FGF23, циркулирующего и ренального  $\alpha$ Klotho.

**Ключевые слова:** неорганический фосфат, паратиреоидный гормон, фактор роста фибробластов 23, белок  $\alpha$ Klotho, хроническая болезнь почек, почечная экскреция фосфата.

### ABSTRACT

**THE AIM:** to ascertain whether  $\alpha$ Klotho and FGF23 are associated with inorganic phosphate urinary excretion in early stages of chronic kidney disease (CKD). **PATIENTS AND METHODS.** The cross-sectional study included 80 patients (age  $40.3 \pm 16.1$ ) with primary immune glomerulopathies and estimated glomerular filtration rate (eGFR) range 30–140 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ . Serum levels of Pi (sPi), intact FGF23, intact PTH, serum  $\alpha$ Klotho (sKlotho), urinary  $\alpha$ Klotho creatinine ratio (uKlotho/uCr) were analyzed. Renal expression of  $\alpha$ Klotho protein (rKlotho) was estimated by morphometric method. Evaluated parameters of renal Pi exchange including fractional excretion of Pi (FEPi) and 24h urinary Pi excretion (uPi24). **RESULTS.** There are no significant differences of sPi and uPi24 in groups of patients with eGFR 140–100, 99–70, 69–50 и 49–30 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ . The level of FEPi increased gradually along with fall of eGFR of 99–70 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$  ( $p < 0.001$ ). FEPi level significantly increased during decrease of eGFR ( $p < 0.001$ ). Compared to eGFR 140–100 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$  rKlotho expression in tubular epithelium was significantly lower at eGFR 99–70 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ , while sKlotho concentration decreased at eGFR 69–50 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ . sKlotho concentration was significantly associated with eGFR, interstitial fibrosis, and glomerular sclerosis. During eGFR decrease the level of PTH increased significantly at eGFR 99–70 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$  compared to eGFR 140–100 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ . The level of FGF23 was significantly higher in patients with eGFR 49–30 ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$ . In patients with eGFR  $\geq 50$  ml/min/ $1.73 \text{ m}^2$  no correlations were found between  $\alpha$ Klotho/FGF23 and indices of Pi metabolism. FGF23 was associated with sPi in patients with eGFR  $< 50$  ml/

Богданова Е.О. 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова. Тел.: (812) 338-69-01; E-mail: evdokia.bogdanova@gmail.com.

min/1.73 m<sup>2</sup>. In the same groups FEPi was associated with PTH level. Neither Klotho nor FGF23 were associated with indices of urinary Pi excretion in multivariable regression analysis. sPi was independently associated with FGF23 ( $\beta=0.50$ ;  $p=0.007$ ), while FEPi with PTH ( $\beta=0.43$ ;  $p=0.003$ ). **CONCLUSION.** The decline of  $\alpha$ Klotho in serum and kidneys occurs on early stages of CKD and apparently associates with tubulointerstitial injury preceding the increase of FGF23. In early stages of CKD the alterations in tubular reabsorption and renal excretion of Pi as important factor of this anion neutral balance support occur independently of circulating FGF23 and renal  $\alpha$ Klotho.

**Key words:** inorganic phosphate, parathyroid hormone, fibroblast growth factor 23,  $\alpha$ Klotho protein, chronic kidney disease, urinary phosphate excretion

## ВВЕДЕНИЕ

Повышение концентрации неорганического фосфата (Pi) в плазме крови связано с увеличением смертности пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) [1, 2]. Ключевым регулятором баланса Pi в условиях снижения функции почек принято считать фактор роста фибробластов 23 (FGF23) и его корецептор  $\alpha$ Klotho [3–6]. К основным почечным эффектам FGF23 относят противодействие ретенции Pi за счет снижения канальцевой реабсорбции [7–10]. Именно этим объясняют нормальные концентрации Pi, сохраняющиеся вплоть до выраженного снижения клубочковой фильтрации [10]. Считается, что снижение уровня  $\alpha$ Klotho и рост FGF23 предшествуют росту концентрации PTH [8]. Данная концепция базируется, главным образом, на клинических исследованиях и экспериментальных моделях выраженной дисфункции почек [10–16], в то время как данные об участии FGF23 и  $\alpha$ Klotho в регуляции обмена Pi на начальных стадиях ХБП ограничены несколькими работами [7–9].

Настоящее исследование предпринято с целью проверки предположения о том, что регуляция экскреции Pi почками на ранних стадиях ХБП действительно связана с изменениями в системе  $\alpha$ Klotho/FGF23.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В обсервационное исследование включили 80 пациентов с первичной иммунной гломерулопатией, подтвержденной морфологически (мужчин – 37, женщин – 43, средний возраст 40,3±16,1 года). Критериями исключения были острое повреждение почек, инфекционные заболевания, сердечная/легочная недостаточность, онкологические заболевания. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Среди обследованных пациентов у 33 диагностировали IgA нефропатию, у 27 – фокально-сегментарный гломерулосклероз, у 13 – мембранозную нефропатию, у 7 – болезнь минимальных изменений. У 22 пациентов расчетная скорость клубочковой фильтрации (pСКФ) составила 140–100 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (группа 1),

у 24 – 99–70 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (группа 2), у 17 – 69–50 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (группа 3), у 17 – 49–30 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (группа 4). Пациенты не получали препараты Ca, витамин D (или его дериваты) и находились на стандартной диете с содержанием белка 0,8–1,0 г/кг массы тела.

Накануне биопсии почки пациентам назначали сбор суточной мочи, а по его окончанию выполняли взятие образца венозной крови и утренней мочи. Кровь и мочу центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин, после чего биоматериал аликвотировали и хранили при температуре –80 °C до проведения анализов. Биоптат почки фиксировали в 5% нейтральном формалине при температуре 22 °C в течение 16 ч. Гистологическую проводку осуществляли с помощью автоматического процессора Tissue-Tek Vip 5Jr (Sakura Finetek Inc., США) с применением раствора IsoPREP (БиоВитрум, Россия). Для пропитывания обезвоженной ткани и приготовления блоков применяли среду для заключения HISTOMIX (БиоВитрум, Россия). Срезы толщиной не более 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме Accu-cut SRM (Sakura Finetek Inc., США).

*Биохимические исследования и иммуноферментный анализ*

Концентрацию Pi, креатинина (Cr) в сыворотке крови и моче определяли на автоматическом анализаторе SYNCHRON CX DELTA (Beckman Coulter, США) с использованием стандартных реагентов «Phosphorus», «Creatinine» (Beckman Coulter, США). Расчет СКФ производили по формуле CKD EPI [17].

Расчет фракционной экскреции Pi осуществляли по формуле:

$$FE_{Pi} (\%) = [(uPi \cdot sCr)/(sPi \cdot uCr)] \cdot 100, \text{ где}$$

uPi – концентрация фосфора в моче, sCr – концентрация креатинина в сыворотке, sPi – концентрация фосфора в сыворотке, uCr – концентрация креатинина в моче.

Расчет абсолютной мочевой экскреции Pi осуществляли по формуле:

$$uPi_{24} (\text{ммоль}) = uPi \cdot D, \text{ где}$$

uPi – концентрация фосфора в моче, D – диурез.

Измерение концентрации интактного РТН в сыворотке крови проводили на автоматическом анализаторе Access Immunoassay System (Beckman Coulter, США) с использованием тест-системы «Intact РТН» (Beckman Coulter, США). Измерение концентрации интактного FGF23 в крови и белка  $\alpha$ Klotho в крови (sKlotho) и моче (uKlotho) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем «FGF23 ELISA Kit» (Kainos Laboratories, Inc., Япония) и «Human soluble  $\alpha$ -Klotho Assay Kit» (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Япония), соответственно.

#### Гистологические исследования

Для детекции  $\alpha$ Klotho в почке (rKlotho) использовали поликлональные антитела ab69208 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:450, систему визуализации REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB (Spring Bioscience, США). Демаскировку антигена проводили в буфере рН 6,0 при температуре 90 °С в течение 25 мин на приборе для высокотемпературной демаскировки антигена (Thermo Scientific, США). Срезы окрашивали гематоксилином.

Экспрессию rKlotho исследовали в участках препарата с относительно сохранной структурой (без существенных фибропластических изменений) при помощи программно-аппаратного комплекса «Видео Тест-Морфология 5.2» (ООО «Видеотест», Россия). Содержание rKlotho оценивали как отношение площади продукта реакции к площади поля зрения в десяти полях зрения. Для всех микропрепаратов применяли окрашивание гематоксилином и эозином, трихромную окраску по Массону, окраску конго красным, PAS-реакцию, серебрение по Джонсу. При световой микроскопии количественно оценивали долю склерозированных клубочков с признаками сегментарного и глобального склероза.

Выраженность гломерулярного склероза оценивали как индекс (ИГС):

$$\text{ИГС (\%)} = \frac{[\text{ГС} + 1/2 \cdot \text{СС}]}{N_r} \cdot 100, \text{ где}$$

ГС – количество полностью склерозированных клубочков, СС – количество клубочков с сегментарным склерозом,  $N_r$  – число клубочков в препарате.

Выраженность интерстициального фиброза, дистрофии и атрофии канальцев оценивали полуколичественно в баллах (0 – <10%; 1 балл – 10–25%; 2 балла – 26–50%; 3 балла – 51–75%, 4 балла – >75%).

#### Статистический анализ

При нормальном распределении переменной данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), для сравнения средних значений в двух выборках применяли t-критерий Стьюдента. При отсутствии нормального распределения данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Для сравнения средних значений в двух выборках применяли критерий Манна–Уитни. Для идентификации пар выборок, отличающихся друг от друга средними значениями, использовали апостериорный критерий Фишера (one-way ANOVA). Для исследования связей между переменными рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена и выполняли множественный линейный регрессионный анализ. Критический уровень значимости для всех статистических тестов принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Показатели метаболизма неорганического фосфата

Достоверных различий концентрации sPi и uPi24 в группах, стратифицированных по рСКФ,

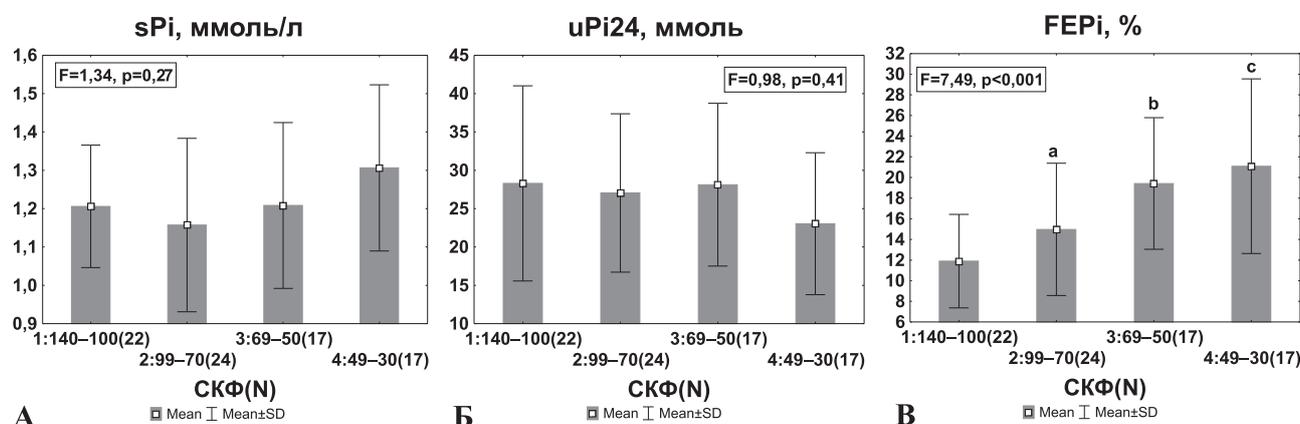


Рис. 1. Показатели метаболизма Pi в группах 1–4: концентрация sPi (А), абсолютная экскреция Pi – uPi24 (Б), FE<sub>pi</sub> (В) в группах, стратифицированных по рСКФ. По оси абсцисс указан диапазон рСКФ и число наблюдений в группе (в скобках); а –  $p_{1-2}=0,046$ ; б –  $p_{1-3}<0,001$ ,  $p_{2-3}=0,028$ ; в –  $p_{1-4}<0,001$ ,  $p_{2-4}=0,009$ ,  $p_{3-4}=0,49$ .

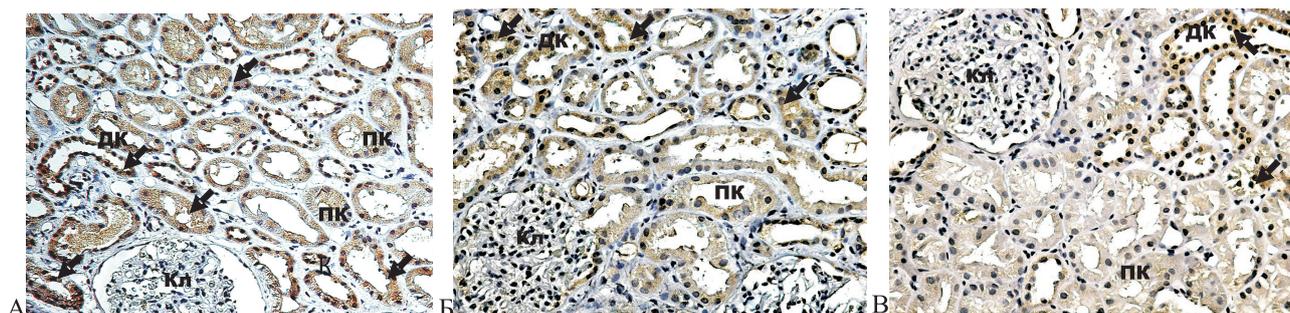


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии экспрессии  $\alpha$ Klotho в почке (объектив 20х, окуляр 10х): А – группа 1, Б – группа 2, В – объединенная группа 3–4. В указанных стрелками областях наблюдается специфическая ИГХ реакция с антителами к  $\alpha$ Klotho, ДК – дистальный каналец, ПК – проксимальный каналец, Кл – клубочек.

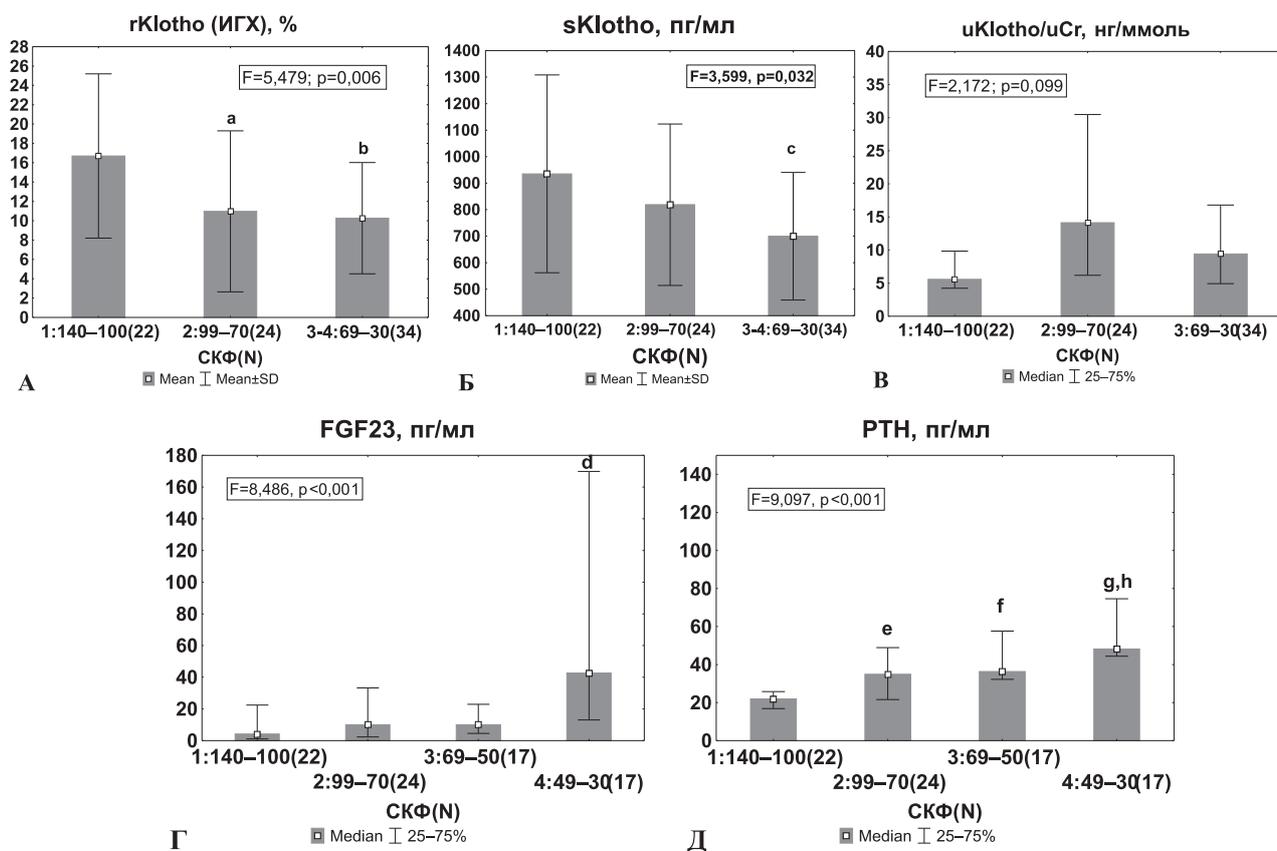


Рис. 3. Относительная площадь экспрессии rKlotho (А), концентрация sKlotho в циркуляции (Б), концентрация uKlotho, стандартизированная по концентрации uCr (uKlotho/uCr) (В), FGF23 (Г) и PTH (Д) в группах, стратифицированных по рСКФ. По оси абсцисс указан диапазон рСКФ и число наблюдений в группе (в скобках); а –  $p=0,036$ , б –  $p=0,015$ , с –  $p=0,041$  при сравнении с группой 1; д –  $p<0,034$  при сравнении с группами 1, 2, 3; е –  $p=0,040$ , ф –  $p=0,010$ , г –  $p=0,018$  при сравнении с группой 1, h –  $p=0,028$  при сравнении с группой 3.

выявлено не было (рис. 1 А, Б). Уровень  $FE_{P_i}$  достоверно возрастал по мере снижения рСКФ (см. рис. 1, В).

#### Klotho, FGF23 и PTH

Экспрессия rKlotho выявлена в тубулярном эпителии. Продукт ИГХ реакции в дистальных канальцах и собирательных трубках коркового вещества почки имел более интенсивную окраску, чем в проксимальных канальцах (рис. 2). Площадь экспрессии rKlotho была достоверно ниже в

группе 2 и объединенной группе 3–4 в сравнении с группой 1 (рис. 3, А).

Концентрация sKlotho имела достоверную прямую связь с рСКФ ( $r=0,35$ ,  $p=0,002$ ) и обратную – с выраженностью склеротических изменений: атрофии канальцев ( $r=-0,44$ ,  $p=0,037$ ), очагового интерстициального фиброза ( $r=-0,43$ ,  $p=0,025$ ) и ИГС ( $r=-0,45$ ,  $p=0,015$ ). При сравнительном анализе уровень sKlotho был ниже в объединенной группе с рСКФ 69–30 мл/мин на  $1,73 \text{ м}^2$  в сравнении

**Анализ корреляционных связей между показателями обмена Pi и фосфотоническими факторами (указаны коэффициенты корреляции Спирмена и значения r)**

Показатель	Вся группа, n=80			pСКФ≥50 мл/мин на 1,73 м <sup>2</sup> , n=63			pСКФ 30–49 мл/мин на 1,73 м <sup>2</sup> , n=17		
	sPi, ммоль/л	uPi24, ммоль	FE <sub>pi</sub> , %	sPi, ммоль/л	uPi24, ммоль	FE <sub>pi</sub> , %	sPi, ммоль/л	uPi24, ммоль	FE <sub>pi</sub> , %
rKlotho, %	-0,19 0,089	0,01 0,42	-0,28* 0,012	-0,11 0,41	-0,07 0,561	-0,22 0,09	-0,11 0,65	-0,04 0,86	-0,12 0,61
sKlotho, пг/мл	-0,15 0,20	0,03 0,21	-0,22 0,05	-0,11 0,42	-0,01 0,96	-0,07 0,61	0,22 0,44	0,40 0,14	-0,42 0,11
uKlotho/uCr, пг/ммоль	0,14 0,21	-0,18 0,07	-0,01 0,89	0,13 0,28	-0,12 0,34	-0,04 0,78	-0,01 0,97	-0,33 0,19	-0,25 0,31
FGF23, пг/мл	0,16 0,15	-0,03 0,71	0,35* 0,001	0,01 0,94	0,08 0,55	0,18 0,14	0,53* 0,027	-0,09 0,71	0,46 0,06
PTH, пг/мл	0,13 0,27	-0,04 0,73	0,45* <0,001	-0,06 0,65	0,02 0,90	0,28* 0,023	0,31 0,22	-0,07 0,76	0,58* 0,013

\* Достоверные различия.

с группой 1 (см. рис. 3, Б), а уровень uKlotho/uCr достоверно не различался (см. рис. 3, В).

По мере снижения pСКФ было выявлено достоверное увеличение PTH, начиная с pСКФ 99–70 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> в сравнении с pСКФ 140–100 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (см. рис. 3, Д). Значения FGF23 были достоверно выше только в группе пациентов с pСКФ 49–30 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> (см. рис. 3, Г).

При корреляционном анализе относительная экскреция фосфата (FE<sub>pi</sub>) была прямо и достоверно связана с концентрациями FGF23, PTH в циркуляции и обратно – с rKlotho в общей группе (табл. 1), uPi24 не имел достоверных связей ни с одним из изученных фосфотонических факторов. Достоверных взаимосвязей показателей обмена Pi и фосфотонических факторов αKlotho/FGF23 в подгруппах больных с pСКФ ≥ 50 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> и pСКФ < 50 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> не выявлено. В этих же подгруппах FE<sub>pi</sub> имела достоверную корреляционную связь с уровнем PTH. У больных с pСКФ < 50 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> концентрация FGF23 прямо коррелировала с sPi (см. табл. 1).

Множественный регрессионный анализ показал, что факторами, независимо связанными с уровнем rKlotho, являются только pСКФ (β=0,52; p=0,044) и uKlotho/uCr (β=-0,28; p=0,019), sKlotho – ИГС (β=-0,30; p=0,018) и тубулоинтерстициальные изменения (ТИИ) (β=-0,30; p=0,034). Концентрации FGF23, как и PTH, не зависели от уровней sKlotho и rKlotho. Независимыми предикторами концентрации FGF23 были PTH (β=0,35; p=0,011), sPi (β=0,37; p=0,003) и ТИИ (β=0,30; p=0,033), а PTH – pСКФ (β=-0,41; p=0,032) и FGF23 (β=-0,41; p=0,011).

Ни αKlotho, ни FGF23 не вошли в число независимых факторов, связанных с индексами мочевого

эксcreции Pi. Прямую достоверную связь с sPi имел FGF23, с FE<sub>pi</sub> – PTH (табл. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические данные определенно показали, что на ранних стадиях снижения клубочковой фильтрации экспрессия белка αKlotho в почке отчетливо снижается при отсутствии достоверных изменений уровня FGF23. Очевидно, что суммарная экспрессия αKlotho в поврежденной почке должна определяться выраженностью фибропластических изменений органа в результате уменьшения массы тубулярного эпителия. Именно этим объясняется отчетливая прямая связь sKlotho и pСКФ, поскольку эпителиальные клетки канальцев считаются основным источником sKlotho в циркуляции [18]. Вместе с тем, нами впервые установлено, что, по крайней мере, при протеинурической гломерулопатии, уровень ренального αKlotho снижается

Таблица 2

**Переменные, связанные с показателями метаболизма Pi (множественный линейный регрессионный анализ); указаны значения коэффициента β и r**

Зависимая переменная	Независимые переменные				
	Пол	pСКФ	sPi	PTH	FGF23
sPi	–	–	–	–	0,50 0,007
uPi24	0,30 0,002	0,33 0,034	-0,25 0,022	–	–
FE <sub>pi</sub>	0,25 0,023	–	–	0,43 0,003	–

Примечание. Коррекция моделей по возрасту, rKlotho, sKlotho, uKlotho/uCr, индексу гломерулярного склероза, тубулоинтерстициальным изменениям (кроме показателей, приведенных в таблице); знак «–» – указывает на отсутствие связи, пустая ячейка – на то, что данный параметр не был использован в модели.

параллельно с уменьшением рСКФ и в зонах органа с сохраненной структурой. Возможным механизмом может быть ингибирование экспрессии гена  $\alpha$ Klotho (*KL*), опосредованное увеличением трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 [19, 20], продукцией ингибиторов сигнального пути Wnt – белков Dickkopf1, склеростина [21], снижением образования кальцитриола [22, 23], а также снижением ингибирующих влияний последнего на ренин-ангиотензиновую систему [24].

Полученные нами результаты определенно указывают на то, что уменьшение почечного и циркулирующего пула  $\alpha$ Klotho является первичным событием по отношению к дисрегуляции FGF23. Предполагают, что на поздних стадиях ХБП повышение концентрации FGF23 в плазме обусловлено резистентностью почки к его действию на фоне выраженного снижения популяции эпителия канальцев и  $\alpha$ Klotho [25]. В отношении ранних стадий ХБП, когда канальцы относительно сохранены, нами не было получено никаких данных в пользу того, что инициальным механизмом повышения FGF23 может быть снижение  $\alpha$ Klotho в почке. Уровень интактного FGF23 достоверно повышался только при рСКФ 49–30 мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup> в сравнении с более высокими значениями рСКФ и был независимо ассоциирован с  $P_i$  сыворотки крови при множественном регрессионном анализе. Рост FGF23 происходит гораздо позднее снижения  $\alpha$ Klotho и не связана с последним при корреляционном и многомерном регрессионном анализе ни в общей выборке, ни в группах больных с рСКФ  $\geq 50$  и  $< 50$  мл/мин на 1,73 м<sup>2</sup>. Данные факты делают весьма вероятным предположение о том, что механизмы регуляции синтеза  $\alpha$ Klotho и FGF23 в условиях нарушения обмена  $P_i$  при ХБП различны и реализуются независимо. Редукция  $\alpha$ Klotho в почке и циркуляции является ранним признаком прогрессирования ХБП и может рассматриваться как биомаркер патологического процесса. Повышение же FGF23 отчетливо связано с развитием гиперфосфатемии при выраженном снижении рСКФ и, с физиологической точки зрения, отражает реакцию остецитов на выраженную ретенцию  $P_i$ . Согласно полученным результатам, другим независимым предиктором уровня FGF23 при ХБП является РТН (см. табл. 2), что соответствует экспериментальным данным о стимуляции РТН образования FGF23 остеocytes [26–28].

В модельных исследованиях было показано, что  $\alpha$ Klotho может обладать и FGF23-опосредованным, и самостоятельным фосфатурическим действием [5]. Следовательно, *снижение*  $\alpha$ Klotho при неиз-

менном уровне FGF23 должно было бы приводить к *увеличению* тубулярной реабсорбции  $P_i$  и снижению его мочевой экскреции. Вместе с тем, по мере снижения рСКФ при неизменной абсолютной экскреции фракционная экскреция  $P_i$  отчетливо увеличивалась вопреки снижению содержания  $\alpha$ Klotho и в почке, и в циркуляции. Похожие результаты были недавно получены в независимом исследовании у больных с ранними стадиями дисфункции почек, у которых фракционная экскреция  $P_i$  продолжала увеличиваться по мере снижения клубочковой фильтрации и достоверного снижения экспрессии мРНК  $\alpha$ Klotho в почке, при отсутствии изменений в уровнях FGF23 [9], что полностью согласуется и с экспериментальными наблюдениями, сделанными нами ранее [29].

Таким образом, полученные данные делают очевидным, что на ранних стадиях ХБП ни  $\alpha$ Klotho, ни FGF23 не связаны с абсолютным и относительным выделением  $P_i$  почками. Если такая связь не является очевидной при ранней дисфункции почек, то на более поздних стадиях ХБП и при дальнейшем снижении числа функционирующих тубулярных эпителиоцитов возможность существенного влияния  $\alpha$ Klotho/FGF23 на выделение  $P_i$  с мочой представляется маловероятной. В целом, подобные факты и рассуждения ставят под сомнение общепринятую точку зрения об участии почечных эффектов FGF23 и  $\alpha$ Klotho в поддержании нейтрального баланса  $P_i$  на ранних стадиях ХБП [1, 5, 6, 15] и требуют пересмотра инициальных механизмов дисрегуляции почечного обмена  $P_i$  при начальном снижении клубочковой фильтрации. В то же время, хорошо известно о прямом действии РТН на проксимальные канальцы, приводящем к снижению реабсорбции  $P_i$  и фосфатурическому эффекту [30, 31]. Помимо этого, РТН осуществляет опосредованную регуляцию баланса  $P_i$ , ингибируя транскрипцию гена цинковой металлоэндопептидазы PHEX (phosphate regulating endopeptidase homolog X-linked) [32]. Физиологическим субстратом PHEX являются белки SIBLING семейства – DMP1 (dentin matrix protein 1), MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein), остеоонтин и др. В результате протеолиза SIBLING образуются фосфорилированные пептиды ASARM (acidic serine aspartate rich motif), устойчивые к гидролизу PHEX. В свою очередь, эта система может иметь прямое отношение к регуляции FGF23, поскольку известно, что интегрин-опосредованное взаимодействие PHEX и DMP1 вызывает снижение FGF23 в результате нарушения его стабильности [33]. Напротив, конкурентное высокоаффинное связывание пептидов ASARM с PHEX приводит к увеличению

FGF23 [33]. Кроме того, пептиды ASARM способны независимо от PHEX оказывать фосфатурический эффект, напрямую взаимодействуя с транспортерами Pi в проксимальных канальцах [34], и могут претендовать на роль фосфотонинов ранних стадий ХБП. В целом, ревизия вклада PTH, PTH-опосредованных механизмов регуляции экскреции Pi почками в условиях начального снижения функции почек требует дополнительных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системное снижение уровня  $\alpha$ Klotho в почке и циркуляции происходит на ранних стадиях ХБП, предшествует росту концентрации FGF23 и, положительно, связано с повреждением тубулоинтерстиция. На ранних стадиях ХБП изменение тубулярной реабсорбции и почечной экскреции Pi, как важного фактора поддержания нейтрального баланса данного аниона, происходит независимо от FGF23, циркулирующего и ренального  $\alpha$ Klotho.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology* 2009; 24: 17-25
- Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(2): 520-528
- Craver L, Marco MP, Martinez 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
- Hruska KA, Mathew S, Lund R et al. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008; 74(2): 148-157
- Hu MC, Kuro-o M, Moe OW et al. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180: 47-63
- Добронравов ВА. Современный взгляд на патофизиологию вторичного гиперпаратиреоза: роль фактора роста фибробластов 23 и Klotho. *Нефрология* 2011; 15(4): 11-20 [Dobronravov VA. Sovremennyy vzgljad na patofiziologiju vtorichnogo giperparatireoza rol' faktora rosta fibroblastov 23 i Klotho. *Nefrologija* 2011; 15(4): 11-20]
- Asai O, Nakatani K, Tanaka T et al. Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int* 2012; 81: 539-547
- Pavik I, Jaeger P, Ebner L et al. Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(2): 352-359
- Sakan H, Nakatani K, Asai O et al. Reduced Renal  $\alpha$ -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
- Fliser D, Kollerits B, Never U et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18 (9): 2600-2608
- 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
- Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension* 2009; 54: 810-817
- 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
- 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
- Kuro-o M. Phosphate and Klotho. *Kidney Int* 2011; 79 (121): 20-23
- Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M et al. FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 78 (7): 679-685
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009. 150(9):604-612
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 6;390(6655):45-51
- Irifuku T, Doi S, Sasaki K. Inhibition of H3K9 histone methyltransferase G9a attenuates renal fibrosis and retains klotho expression. *Kidney Int* 2015; doi: 10.1038/ki.2015.291
- Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN. TGF- $\beta$ : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016; 38(1):39-49
- Fang Y, Ginsberg C, Seifert M et al. CKD-Induced Wingless/Integration1 Inhibitors and Phosphorus Cause the CKD-Mineral and Bone Disorder. *JASN* 2014; 25(8):1760-1773
- Tsujikawa H, Kurotaki X, Fujimori T et al. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 2003; 17 (12): 2393-2403
- Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 28;414(3):557-562
- De Borst MH, Vervloet MG, Ter Wee PM, Navis G. Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(9):1603-1609
- Spichtig D, Zhang H, Mohebbi N. Renal expression of FGF23 and peripheral resistance to elevated FGF23 in rodent models of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2014;85(6):1340-1350
- Rhee Y et al. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone* 2011; 49: 636-643
- Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T et al. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:F882-F889
- Lopez I, Rodriguez-Ortiz ME, Almadan Y et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int* 2011; 80 (5): 475-482
- Добронравов ВА, Богданова ЕО, Семенова НЮ и др. Почечная экспрессия белка  $\alpha$ Klotho, 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 NJu i dr. Pochechnaja ehkspressija belka  $\alpha$ Klotho faktor rosta fibroblastov 23 i paratireoidnyj gormon pri ehksperimental'nom modelirovanii rannih stadij hronicheskogo povrezhdenija pochek. *Nefrologija* 2014; 18(2):72-78]
- Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol* 2005; 187 (3): 311-325
- Silver J, Naveh-Manly T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9: 641-649
- Pellicelli M, Taheri M, St-Louis M. PTHrP(1-34)-mediated repression of the PHEX gene in osteoblastic cells involves the transcriptional repressor E4BP4. *J Cell Physiol* 2012; 227(6):2378-2387
- Rowe PSN. The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled. *Cell Biochem Funct* 2012; 30(5):355-375
- David V, Martin A, Hedge AM. ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(3):783-791

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №13-04-01886).*

**Сведения об авторах:**

Богданова Евдокия Олеговна  
Россия, 197022, 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. Тел.: (812) 338-69-01; E-mail: evdokia.bogdanova@gmail.com.

Bogdanova Evdokia  
Affiliations: Russia, 197022, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build. 54, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Institute of Nephrology Laboratory of Biochemical Homeostasis Phone (812) 338-69-01; E-mail: evdokia.bogdanova@gmail.com.

Галкина Ольга Владимировна, канд. биол. наук  
Россия, 197022, 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. Тел.: (812) 338-69-01; E-mail: ovgalkina@mail.ru.

Olga V. Galkina PhD  
Affiliations: Russia, 197022, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build. 54, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Institute of Nephrology Laboratory of Biochemical Homeostasis, head, Phone (812) 338-69-01; E-mail: ovgalkina@mail.ru.

Зубина Ирина Михайловна, канд. биол. наук  
Россия, 197022, 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. Тел.: (812) 338-69-01; E-mail: zubina@list.ru.

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

Проф. Добронравов Владимир Александрович  
Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д.17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, заместитель директора. Тел.: (812) 338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru

Prof. Vladimir A. Dobronravov, MD, PhD, DSc  
Affiliations: Russia, 197022, St. Petersburg, L. Tolstoy st., 17, build. 54, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University Institute of Nephrology, Vice Director, Phone (812) 338-69-01; E-mail: dobronravov@nephrolog.ru

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Поступила в редакцию: 10.03.2016 г.  
Принята в печать: 12.05.2016 г.