

На правах рукописи

БОГДАНОВА

Евдокия Олеговна

**РОЛЬ α КЛОТНО И ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 23 В
РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ФОСФАТА ПРИ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕК**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор **Добронравов Владимир Александрович**

Официальные оппоненты:

Гильманов Александр Жанович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой лабораторной диагностики Института дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Шишкин Александр Николаевич – доктор медицинских наук профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «11» октября 2018 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

М.В. Санников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Фосфор играет важную роль в биологии клетки, так как вовлечен в большинство процессов, начиная с синтеза нуклеиновых кислот, сигнальной трансдукции и метаболизма липидов, заканчивая минерализацией внеклеточного матрикса [Berndt T., Kumar R., 2009]. В циркуляции фосфор представлен в форме неорганического фосфата (Pi). Высокие концентрации Pi, как и его дефицит, губительны для организма. Накопление Pi токсично для клеток и отчетливо связано с увеличением рисков смерти как у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП), так и в общей популяции [McGovern A.P. et al., 2013; Fang Y. et al., 2014].

Гомеостаз Pi в организме поддерживается системными и локальными факторами, регулирующими кишечную абсорбцию, почечную экскрецию/реабсорбцию, ремоделирование костной ткани [Лот К., 2005; Hu M.C. et al., 2013]. При этом, почечная экскреция является основным механизмом поддержания гомеостаза Pi в организме – в физиологических условиях практически весь абсорбированный в кишечнике Pi экскретируется почками [Berndt T. and Kumar R., 2009; Shaikh A., 2008]. ХБП сопряжена с формированием системного дисбаланса Pi, приводящим к минеральным и костным нарушениям (ХБП-МКН), среди которых кальцификация сосудов и аорты является преобладающей причиной смерти пациентов [Ix J.H. et al., 2009; Patange A.R. et al., 2013; Rika J., Tatsuo S., 2014]. В качестве лабораторных критериев ХБП-МКН в настоящее время рекомендуют использовать концентрации Ca, Pi, паратиреоидного гормона (PTH), общей щелочной фосфатазы (ЩФ) и кальцидиола в сыворотке крови [KDIGO, 2009]. При этом известно, что концентрации сывороточных Ca и Pi, как и ЩФ и PTH, продолжительное время поддерживаются в пределах нормальных значений вплоть до 4-5 стадий ХБП. Концентрация кальцидиола при прогрессировании ХБП достоверно не изменяется, а низкие значения данного показателя могут означать наличие предсуществующего дефицита витамина D, характерного для жителей Санкт-Петербурга и Северо-запада России [Каронова Т.Л. и др., 2016]. В свою очередь, инструментальные методы исследования фиксируют необратимые изменения и не могут быть отнесены к ранней диагностике.

Известно, что изменения метаболизма Pi, приводящие к развитию осложнений на поздних стадиях ХБП, происходят уже при начальном снижении функции почек [Craver L. et al., 2007, Dobronravov V. et al., 2012], исследование данных процессов открывает новые возможности для ранней клинической лабораторной диагностики ХБП-МКН.

Степень разработанности темы исследования.

Полученные за последнее десятилетие данные доказывают, что активным участником формирования системного дисбаланса Pi при ХБП является фактор роста фибробластов 23 (FGF23) [Добронравов В.А., 2011; Hu M.C. et al., 2013]. FGF23, как и PTH, является фосфотонином, действует как регулятор

позитивного баланса P_i , но в отличие от PTH, оказывает ингибирующее воздействие на кальцитриол (1,25(OH) $_2$ D $_3$) [Razzaque M.S., Lanske B., 2007]. Биологическая активность и тканеспецифичность действия FGF23 обусловлены наличием его ко-рецептора – белка α Klotho (Klotho) [Urakawa I. et al., 2006]. Помимо рецепторной функции белок Klotho, способен оказывать FGF23-независимое влияние на минеральный метаболизм благодаря альфа-глюкозидазой активности, позволяющей модулировать активность кальциевых (TRPV5) и калиевых (ROMK) ионных каналов и натрий-фосфатных ко-транспортеров (NPT-2a, b, c) [Hu M.C., Kuro-o M., Orson W., 2012]. Кроме того, Klotho способен ингибировать действие ростовых факторов – TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) и IGF-I (insulin-like growth factor I), препятствуя прогрессированию фиброза [Doi S. Et al., 2011; Zhou L et al., 2015], кальцификации сосудов [Lim K. et al., 2012], ремоделированию миокарда [Song S. et al., 2013; Yang K et al., 2015].

В настоящее время считается, что изменения в регуляторной системе FGF23/FGFR/Klotho являются первичными при формировании системного дисбаланса P_i [Добронравов В.А., 2011; Hu M.C. et al., 2013; Lu X., Hu M.C., 2016]. В ряде работ показано, что повышение концентрации FGF23 предшествует значительному росту концентрации PTH [Isakova T. et al., 2011; Pavik I. et al., 2013; Spichtig D. et al., 2014], а сам FGF23 может являться важным регулятором активности PTH в почке и костной ткани [Drüeke T.V., 2010; Andrukhova O. et al., 2016]. Снижение экспрессии мРНК Klotho в почке, уровня Klotho в моче также выявлены на начальных стадиях экспериментальной дисфункции почек [Barker S.L. et al., 2014, Dobronravov V. et al., 2012]. Следует отметить, что представления о доминирующей роли FGF23 в регуляции фосфатного обмена почками преимущественно основаны на данных, полученных в генетических моделях гиперпродукции FGF23 у животных с интактными почками, либо при анализе экспериментальных и клинических моделей соответствующих третьей и более поздним стадиям ХБП [Kuro-o M., 2013; Добронравов В.А., 2016], в то время как экскреция P_i значительно возрастает уже на первой стадии ХБП [Haruna Y. et al., 2007; Yilmaz M.I. et al., 2010]. Кроме того, остается не вполне ясным, есть ли причинно-следственная связь между активацией системы FGF23/FGFR/Klotho и фосфатурией при начальном снижении скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Также неизвестно, является ли рост концентрации FGF23 результатом органной резистентности к его действию в условиях характерного для ХБП снижения Klotho [Razzaque M.S., Lanske B., 2007; Hu M.C. et al., 2013].

Комплексное исследование рутинных и новых показателей баланса P_i при начальном снижении функции почек в эксперименте позволило выявить кандидатные маркеры формирования системного дисбаланса P_i , клиническое исследование – оценить их информативность для осуществления ранней предикции патологических состояний, приводящих к смерти пациентов на продвинутых стадиях ХБП.

Цель исследования – Установить роль фосфат-регулирующей системы FGF23/FGFR1/Klotho в поддержании мочевой экскреции неорганического фосфата и оценить клиническую значимость определения циркулирующих и ренальных компонентов исследуемой системы для ранней диагностики дисбаланса неорганического фосфата у пациентов с хронической болезнью почек.

Задачи исследования:

1. Изучить метаболизм неорганического фосфата (концентрация P_i в сыворотке, относительная и абсолютная экскреция P_i почками) на начальных стадиях хронического повреждения почек в экспериментальном и клиническом исследованиях.

2. Исследовать изменения ренальной экспрессии рецептора FGF23 – FGFR1, и ко-рецептора Klotho при моделировании хронического повреждения почек; проверить выявленные закономерности в клиническом исследовании ранних стадий ХБП.

3. Изучить взаимосвязь Klotho с изменениями микроархитектоники почки в экспериментальном и клиническом исследованиях; оценить прогностическую значимость определения Klotho в сыворотке крови, моче и почке в качестве раннего лабораторного критерия гломерулосклероза и фибропластических изменений тубулоинтерстиция у пациентов с ХБП.

4. Изучить взаимосвязь изменения уровней ренальных и циркулирующих компонентов системы FGF23/FGFR1/Klotho и увеличения индекса массы миокарда в экспериментальном исследовании у крыс SHR.

5. Определить направленность изменений уровней PTH и новых регуляторов метаболизма P_i – Klotho и FGF23 в экспериментальном исследовании начальных стадий хронического повреждения почек, оценить возможность их применения для ранней клинической лабораторной диагностики формирования системного дисбаланса P_i .

Научная новизна исследования. Впервые в экспериментальном и клиническом исследовании детально изучен характер изменений компонентов регуляторной оси FGF23/Klotho при формировании системного дисбаланса P_i в условиях начального снижения функции почек. Данные получены при комплексном анализе как новых – FGF23, Klotho, так и классических биохимических показателей метаболизма P_i .

Впервые в эксперименте и клинике убедительно доказано, что системное снижение содержания Klotho почке и крови предшествует росту FGF23 при ХБП. Помимо этого, доказано, что рост концентрации FGF23 не является результатом редукции ко-рецептора Klotho, а происходит в ответ на формирующуюся ретенцию P_i .

В экспериментальном и клиническом исследованиях доказано участие системы Klotho/FGF23 в регуляции баланса P_i , при этом, Klotho задействован на ранних стадиях, а FGF23 – на более поздних стадиях дисфункции почек и ассоциирован с ретенцией P_i .

В экспериментальном исследовании получены данные, свидетельствующие о FGF23-независимом участии Klotho в формировании одного из проявлений ХБП-МКН – ремоделирования миокарда (гипертрофии миокарда).

Показано, что определение концентрации Klotho в сыворотке крови может быть использовано для оценки деструктивных изменений почечной паренхимы и прогрессирования ХБП.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования способствуют углублению представлений о регуляции минерального метаболизма и пониманию механизмов возникновения системного дисбаланса P_i в условиях начального снижения функции почек при ХБП. В работе получены доказательства целесообразности ранней профилактики нарушений метаболизма P_i у пациентов с ХБП, а также выявлены показатели для применения в клинической лабораторной диагностике осложнений и прогрессирования ХБП.

По результатам исследования выявлены показатели, ассоциированные с формированием системного дисбаланса P_i , их измерение позволит выявлять пациентов, входящих в группу риска формирования ХБП-МКН уже на 2-3 стадиях ХБП, до проявления необратимых признаков патологического процесса, и проводить раннюю клиническую лабораторную диагностику и своевременную терапию.

Показано, что уровень Klotho в сыворотке пациентов ассоциирован с выраженностью склеротических изменений почечной паренхимы – склерозом клубочков и фиброзом тубулоинтерстиция. Определение данного показателя может дополнить рутинное морфологическое исследование и позволит оценить прогрессирование хронического процесса.

Методология и методы исследования. В соответствии с принципом трансляционной медицины на первом этапе работы регуляция метаболизма P_i была детально изучена в экспериментальных моделях начальной дисфункции почек, а затем выявленные закономерности были верифицированы в группе пациентов с начальными стадиями ХБП. В работе использованы общенаучные (анализ данных, синтез) и частные научные методы (лабораторные, статистические). Для моделирования хронического повреждения почек выполняли резекцию 3/4 и 5/6 почек у крыс Вистар и крыс линии SHR, сроки эксперимента составили 1 или 2 месяца. В качестве контроля использовали животных с ложной операцией. Анализировали содержание белка Klotho и рецептора FGF23 (FGFR1) в тубулярном эпителии (иммуногистохимия, морфометрия), концентрации интактного FGF23, интактного PTH в сыворотке крови, Klotho в сыворотке крови и моче (иммуноферментный анализ), P_i креатинина, в сыворотке крови и моче, мочевины в сыворотке, концентрацию белка в моче (автоматизированные биохимические методы). Иммуногистохимическое исследование выполняли с использованием первичных антител Abscam (Великобритания), Spring Bioscience (США), вторичных антител Dako (Дания) и полимерной системы визуализации Dako

(США). Морфологическую оценку препаратов осуществляли на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 со встроенной фотокамерой с помощью программного обеспечения анализа изображений «Видео Тест-Морфология 5.2» с окуляром $\times 10$, при объективах $\times 20$, $\times 40$. Анализ гистологических препаратов выполняли в 10 полях зрения для каждого образца.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Рост почечной экскреции неорганического фосфата, свидетельствующий о формирующемся дисбалансе его метаболизма, происходит уже на ранних стадиях хронического повреждения почек.

2. Развитие ранних стадий хронического повреждения почек в эксперименте и клинике сопровождается снижением уровня ренального (тубулярного) и циркулирующего Klotho, прогрессирующим параллельно увеличению фибропластических изменений почек и существенно опережающим повышением концентрации FGF23 в сыворотке. У пациентов на ранних стадиях ХБП определение концентрации Klotho в сыворотке крови может быть использовано для клинической лабораторной диагностики деструктивных изменений почечной паренхимы и оценки прогрессирования ХБП.

3. Увеличение экскреции неорганического фосфата как реакция почек на ретенцию этого аниона в условиях начального снижения клубочковой фильтрации происходит независимо от изменений уровней сывороточного и ренального Klotho, FGFR1 в почке и FGF23 в циркуляции. Рост концентрации FGF23 в сыворотке на более поздних стадиях ХБП прямо ассоциирован с концентрацией P_i в крови и является предиктором гиперфосфатемии.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Достоверность и обоснованность результатов работы обеспечена комплексным анализом биохимических и морфологических параметров метаболизма неорганического фосфата у 72 животных с экспериментальной дисфункцией почек и 80 пациентов с начальными стадиями хронической болезни почек с использованием современных методов гистологических, иммунологических и биохимических исследований и подтверждена методами статистической обработки полученных данных, адекватными поставленным задачам. Результаты научных положений документированы таблицами, рисунками, графиками, фотографиями.

На основании результатов проведенных исследований определены показатели для ранней лабораторной диагностики системного дисбаланса P_i при ХБП и оценки прогрессирования фибропластических и склеротических изменений почки.

Результаты работы представлены, доложены и обсуждены на LXXIV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины» (Санкт-Петербург, Россия, 2013 г.), VII семинаре последипломного образования «Актуальные вопросы нефрологии и диализа: проблемы диетотерапии» (Санкт-Петербург, Россия, 2014 г.), научно-практической конференции «Инновационные технологии и клиническая

значимость лабораторных тестов» (Саратов, Россия, 2015 г.), научно-образовательном форуме «Лабораторная медицина России: современные технологии, внедрение новых тестов, организационные проблемы» (Симферополь, Россия, 2015), научно-практической конференции «Лабораторная диагностика в решении проблем современной клинической медицины» (Санкт-Петербург, Россия, 2015 г.), Конгрессе Европейской Ассоциации Нефрологов «ERA-EDTA 52nd Congress» (Лондон, Великобритания, 2015), Конгрессе Европейской Ассоциации Нефрологов «ERA-EDTA 53 Congress» (Вена, Австрия, 2016), Конгрессе Европейской Ассоциации Нефрологов «ERA-EDTA 54 Congress» (Мадрид, Испания, 2017).

Основные результаты исследования внедрены в практику учебной работы кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, в практику лечебной работы клиник ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения России. Организация и проведение диссертационного исследования одобрены независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения России.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 в научно-практических журналах, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук.

Личное участие автора в получении результатов. Автором лично проведены анализ литературных данных и планирование диссертационной работы, организация исследования образцов экспериментального и клинического биоматериала, выполнены биохимические и гистологические исследования, иммуноферментный анализ в Научно-исследовательском институте нефрологии ПСПбГМУ им. И.П.Павлова, фоторегистрация и морфометрия микропрепаратов на кафедре патологической анатомии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, осуществлены статистическая обработка, анализ полученных данных, обобщение результатов исследований, подготовка материалов к публикациям, написание и оформление диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 177 источников: 13 отечественных и 164 зарубежных. Работа содержит 16 таблиц и 19 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом исследований послужили образцы сыворотки крови, суточной мочи и почки экспериментальных животных и пациентов с ХБП. Всего проанализировано 308

образцов сыворотки крови и мочи, 688 гистологических микропрепаратов почки.

Экспериментальное исследование выполнено на взрослых самцах крыс Вистар массой тела 200-250 г и крыс линии SHR массой тела 190-230 г (N=72). Для моделирования начальных стадий хронического повреждения почек применяли резекцию 3/4 или 5/6 объема органа, в качестве контроля использовали ложнопериорированных животных (таблица 1).

Таблица 1 – Группы экспериментальных животных.

Модель, срок экспозиции	Условное обозначение	Количество животных
Вистар ЛО, 2 мес	W2	9
Вистар 3/4 НЭ, 2 мес	W2(3/4)	9
SHR ЛО, 1 мес	SHR1	9
SHR ЛО, 2 мес	SHR2	9
SHR 3/4 НЭ, 1 мес	SHR1(3/4)	9
SHR 3/4 НЭ, 2 мес	SHR2(3/4)	10
SHR 5/6 НЭ, 1 мес	SHR1(5/6)	9
SHR 5/6 НЭ, 2 мес	SHR2(5/6)	8

ЛО – ложная операция, НЭ – нефрэктомия

Клиническое исследование включало биоматериал 80 пациентов с хронической болезнью почек (мужчин – 37, женщин – 43, средний возраст 40 ± 16 лет) (таблица 2). Пациенты давали информированное согласие на участие в исследовании. В зависимости от скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной по формуле СКД-ЕРІ (рСКФ) были сформированы четыре группы (таблица 2). Среди обследованных пациентов у 33 диагностировали IgA нефропатию, 27 – фокально-сегментарный гломерулосклероз, 13 – мембранозную нефропатию, 7 – болезнь минимальных изменений.

Таблица 2 – Группы пациентов с дисфункцией почек.

Группы исследования	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
рСКФ, мл/мин/1,73 м ²	140-100	99-70	69-50	49-30
Средний возраст, лет	32±13	42±17	43±17	44±16
Количество пациентов, n (Ж:М)	22 (12:10)	24 (12:12)	17 (9:8)	17 (10:7)

рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации

Критериями исключения были острое повреждение почек, инфекционные заболевания, сердечная/легочная недостаточность, онкологические заболевания. Пациенты не получали препараты кальция, витамин D или его дериваты и находились на стандартной диете с содержанием белка 0,8 грамма на килограмм массы тела.

Концентрации P_i, креатинина (Cr) в сыворотке крови и моче, мочевины (Ur) в сыворотке крови и общего белка в моче определяли на автоматическом

анализаторе SYNCHRON CX DELTA (Beckman Coulter, США) с использованием соответствующих реагентов «Phosphorus», «Creatinine», «Urea», «Total Protein» и калибратора «SYNCHRON CX MULTI™ Calibrator» (Beckman Coulter, США).

Фракционную экскрецию неорганического фосфата (FEPi) рассчитывали по формуле: $FEPi (\%) = [(uPi \cdot sCr)/(sPi \cdot uCr)] \cdot 100$, где

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

Абсолютную мочевую экскрецию Pi рассчитывали по формуле:

$$uPi24 \text{ (ммоль)} = uPi \cdot D, \text{ где}$$

uPi – концентрация фосфора в моче, D – диурез.

Измерение концентрации интактного PTH в сыворотке крови пациентов проводили при помощи тест-системы «Intact PTH», стандартов «Access Intact PTH Calibrators» и контролей на автоматическом анализаторе Access Immunoassay System (Beckman Coulter, США). Концентрацию интактного PTH в сыворотке крови крыс измеряли методом ИФА при помощи тест-системы «Rat Intact PTH ELISA Kit» (Immutopics, Inc., США). Измерение концентраций FGF23 в сыворотке и белка Klotho в сыворотке и моче проводили методом ИФА с помощью тест-систем «FGF-23 ELISA Kit» (Kainos Laboratories, Inc., Япония) и «Human soluble α -Klotho Assay Kit» (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Япония), соответственно.

При изучении микропрепаратов почки крыс и биоптата почки человека применяли рутинные гистологические окраски и иммуногистохимический (ИГХ) метод. Для исследования содержания Klotho в почке использовали первичные антитела против Klotho ab69208 (Abcam, Великобритания); рецептора FGFR1 – E1058 (Spring Bioscience, США), полимерную систему визуализации Dako EnVision (Dako, США). Морфометрию микропрепаратов осуществляли на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 со встроенной фотокамерой с помощью программного обеспечения анализа изображений «Видео Тест-Морфология 5.2» с окуляром x10 при объективе x40. Анализ гистологических препаратов выполняли количественным и полуколичественным методами в 10 полях зрения для каждого образца. Содержание белка Klotho и FGFR1 в почке оценивали как долю площади специфического продукта от площади тубулоинтерстиция. Выраженность интерстициального фиброза оценивали как долю площади коллагенового фиброза от площади поля зрения (окраска трихром по Масону). У пациентов оценивали долю клубочков с признаками сегментарного и глобального склероза от общего количества клубочков в микропрепарате. 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%).

Выраженность тубулоинтерстициальных изменений (ТИИ) нефробиоптата рассчитывали по формуле:

$ТИИ$ (баллы) = $1/3 \cdot (ЗДК + ГДК + ВДК) + АК + ОИФ$, где

ЗДК – зернистая дистрофия канальцев (баллы), ГДК – гиалиновая дистрофия канальцев (баллы), ВДК – везикулярная дистрофия канальцев (баллы), АК – атрофия канальцев (баллы), ОИФ – очаговый интерстициальный фиброз (баллы).

Выраженность гломерулярного склероза оценивали как индекс (ИГС):

$ИГС$ (%) = $[(ГС + 1/2 \cdot СС) / Nг] \cdot 100$, где

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

Статистический анализ. Данные представлены как среднее и стандартное отклонение ($M \pm SD$) или медиана с интерквартильным размахом ($m(25\%-75\%)$). Для сравнения групп в зависимости от типа переменной и характера распределения применяли следующие тесты: t-критерий Стьюдента для парных и непарных сравнений, тест Манна-Уитни, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), точный критерий Фишера. Для оценки связи между переменными применяли корреляционный анализ. Множественный линейный регрессионный анализ применяли для оценки связи между исследуемыми показателями метаболизма неорганического фосфата, индексом массы миокарда (зависимые переменные) и регуляторами фосфатурии (независимые переменные). Регрессионные модели были скорректированы по другим потенциальным факторам, влияющим на зависимую переменную, путем пошагового включения в анализ. Прогностическую величину показателей оценивали при помощи Receiver Operating Characteristic (ROC) анализа. Межгрупповые различия и регрессионные коэффициенты считали статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальное исследование

Модели начальной дисфункции почек. По мере увеличения тяжести хронического повреждения почек (резекция 3/4, 5/6 органа) и продолжительности эксперимента (1, 2 месяца) были выявлены закономерные для ХБП изменения концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови и белка в моче (таблица 3).

В моделях ХБП имело место достоверное увеличение протеинурии (таблица 3). Относительный прирост креатинина в опытных группах по сравнению с контрольными составил не более 60%. Концентрация мочевины в крови крыс группы W2 соответствовала нормальным значениям, SHR1 – пограничному состоянию между нормой и умеренной уремией, при НЭ – умеренной уремии [Ormrod D., Miller T. 1980]. У экспериментальных животных наблюдали фибропластические изменения почки (рисунок 1). При частичной НЭ (резекции 3/4 органа) площадь интерстициального фиброза составила 15-20

%, при субтотальной нефрэктомии (резекция 5/6) – 30%, в то время как в контрольных группах площадь интерстициального фиброза не превышала 5% от площади тубулоинтерстиция.

Таблица 3 – Основные характеристики функционального состояния почек в экспериментальных группах (M±SD)

Модель, р	Мочевина в сыворотке, ммоль/л	Креатинин в сыворотке, ммоль/л	Белок в моче, г/сутки
W2	4,5±0,5	0,039±0,005	0,009±0,003
W2(3/4)	10,9±2,6	0,061±0,006	0,013±0,005
<i>p</i> _{W2-W2(3/4)}	<0,001	<0,001	0,034
SHR1	6,7±0,8	0,033±0,009	0,023±0,003
SHR1(3/4)	10,2±1,4	0,054±0,005	0,030±0,009
SHR1(5/6)	14,3±1,7	0,067±0,005	0,051±0,015
<i>p</i> _{SHR1-SHR1(3/4)}	<0,001	<0,001	0,039
<i>p</i> _{SHR1-SHR1(5/6)}	<0,001	<0,001	<0,001
<i>p</i> _{SHR1(3/4)-SHR1(5/6)}	<0,001	<0,001	0,002
SHR2	7,8±1,3	0,035±0,002	0,023±0,013
SHR2(3/4)	11,3±1,0	0,060±0,002	0,129±0,042
SHR2(5/6)	16,2±4,6	0,073±0,010	0,184±0,045
<i>p</i> _{SHR2-SHR2(3/4)}	<0,001	<0,001	<0,001
<i>p</i> _{SHR2-SHR2(5/6)}	<0,001	<0,001	<0,001
<i>p</i> _{SHR2(3/4)-SHR2(5/6)}	0,005	0,035	0,017

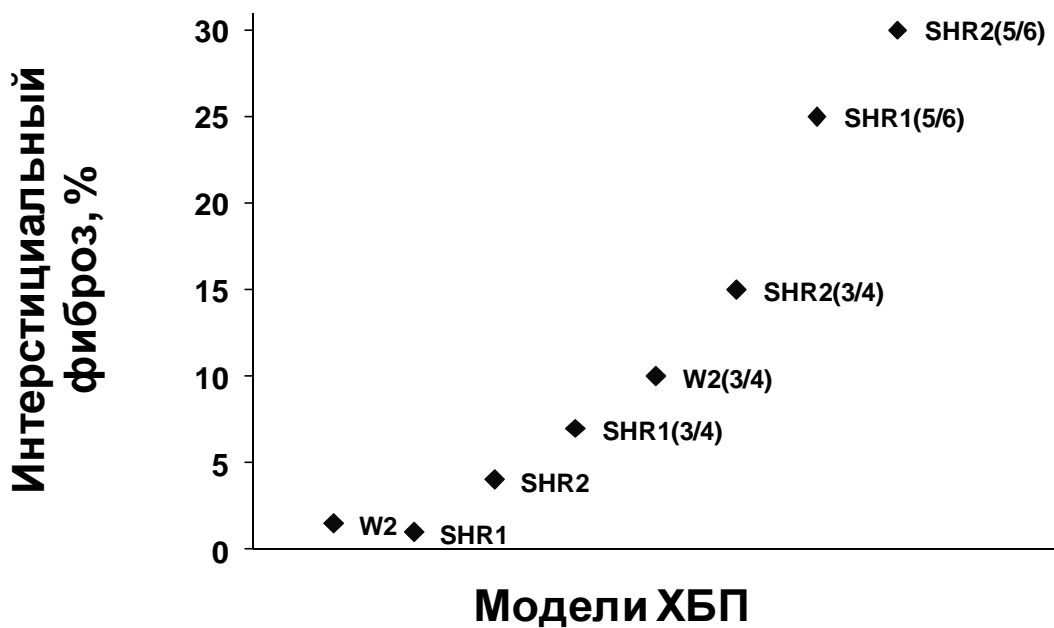


Рисунок 1 – Выраженность интерстициального фиброза в группах экспериментальных животных.

Следовательно, реализованные модели хронического повреждения почек по своим базовым биохимическим и гистологическим характеристикам были сопоставимы с 1-3 стадиям ХБП.

Кальций-фосфатный метаболизм при моделировании ХБП. Концентрации общего кальция в крови и моче у крыс моделей W2(3/4), SHR1(3/4) и SHR1(5/6), SHR2(3/4) и SHR2(5/6) при сравнении с соответствующим контролем W2, SHR1, SHR2, а также при сравнении попарно достоверно не различались (таблица 4).

Таблица 4 – Параметры кальций-фосфатного метаболизма у крыс экспериментальных групп (M±SD)

Модель, р	sPi, ммоль/л	uPi, ммоль/л	sCa, ммоль/л	uCa, ммоль/л	FE _{Pi} , %	uPi ₂₄ , ммоль
W2	2,69±0,25	63,5±17,1	2,58±0,29	0,98±0,44	9,8±1,6	0,49±0,15
W2(3/4)	2,49±0,11	67,7±10,9	2,43±0,10	0,78±0,27	19,6±4,5	0,57±0,11
<i>P_{W2-W2(3/4)}</i>	<i>0,041</i>	<i>0,54</i>	<i>0,185</i>	<i>0,26</i>	<i><0,001</i>	<i>0,24</i>
SHR1	2,85±0,18	73,5±25,1	2,33±0,09	0,98±0,39	14,8±7,2	0,55±0,21
SHR1(3/4)	2,65±0,20	74,7±5,0	2,30±0,094	1,17±0,49	22,6±4,6	0,88±0,15
SHR1(5/6)	2,48±0,14	68,4±11,4	2,25±0,08	1,20±0,66	38,3±7,6	0,95±0,20
<i>P_{SHR1-SHR1(3/4)}</i>	<i>0,046</i>	<i>0,89</i>	<i>0,50</i>	<i>0,17</i>	<i>0,014</i>	<i>0,002</i>
<i>P_{SHR1-SHR1(5/6)}</i>	<i><0,001</i>	<i>0,58</i>	<i>0,066</i>	<i>0,26</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>
<i>P_{SHR1(3/4)-SHR1(5/6)}</i>	<i>0,056</i>	<i>0,15</i>	<i>0,24</i>	<i>0,40</i>	<i><0,001</i>	<i>0,41</i>
SHR2	2,65±0,21	62,3±22,0	2,23±0,09	0,86±0,34	10,6±2,5	0,41±0,22
SHR2(3/4)	2,34±0,20	59,67±10,0	2,33±0,08	1,07±0,30	26,7±7,9	0,98±0,14
SHR2(5/6)	2,14±0,23	53,80±5,5	2,29±0,07	1,15±0,28	35,0±4,5	1,05±0,10
<i>P_{SHR2-SHR2(3/4)}</i>	<i>0,011</i>	<i>0,16</i>	<i>0,054</i>	<i>0,26</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>
<i>P_{SHR2-SHR2(5/6)}</i>	<i><0,001</i>	<i>0,45</i>	<i>0,21</i>	<i>0,12</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>
<i>P_{SHR2(3/4)-SHR2(5/6)}</i>	<i>0,069</i>	<i>0,15</i>	<i>0,21</i>	<i>0,57</i>	<i>0,017</i>	<i>0,27</i>

sPi(Ca) – концентрация неорганического фосфата (кальция) в сыворотке крови; uPi(Ca) – концентрация неорганического фосфата (кальция) в суточной моче; FE_{Pi} – фракционная экскреция Pi почками; uPi₂₄ – суточная экскреция Pi почками.

Снижение концентрации sPi у животных, подвергнутых нефрэктомии, сопровождалось значительным повышением как относительной, так и абсолютной экскреции Pi почками (таблица 4). Фракционная экскреция Pi достоверно увеличивалась во всех опытных группах по сравнению с контролем, и была более интенсивной при большем повреждающем воздействии.

Достоверный рост суточной экскреции P_i наблюдали во всех моделях SHR с НЭ, по сравнению с контролем.

Наблюдаемые изменения базовых показателей обмена P_i – рост относительной и абсолютной экскреции P_i почками и снижение концентрации P_i в сыворотке, возникали на ранних стадиях экспериментального повреждения почек, что может свидетельствовать об активации механизмов поддержания гомеостаза P_i при начальном снижении функции почек в ответ на формирующуюся ретенцию P_i .

Концентрации PTH и FGF23 при моделировании ХБП. Концентрация интактного PTH в сыворотке крови экспериментальных животных несколько повышалась при хроническом повреждении почек, но достоверных различий, как при сравнении моделей с одинаковыми сроками экспериментального воздействия, так и всех групп совместно выявлено не было (таблица 5).

Таблица 5 – Концентрации интактного PTH и интактного FGF23 у крыс (m(25%;75%))

Модель, р	PTH, пг/мл	FGF23, пг/мл
W2	76,7 (63,7; 125,5)	295,5 (258,5;350,9)
W2(3/4)	135,9 (70,4; 157,7)	478,1 (324,2;504,8)
$p_{W2-W2(3/4)}$	0,38	0,034
SHR1	87,4 (74,8; 126,5)	465,8 (371,5; 521,2)
SHR1(3/4)	87,4 (64,1; 109,3)	443,3 (422,8; 799,2)
SHR1(5/6)	148,2 (135,9; 164,7)	805,3 (461,7; 950,1)
$p_{SHR1-SHR1(3/4)}$	0,83	0,98
$p_{SHR1-SHR1(5/6)}$	0,093	0,13
$p_{SHR1(3/4)-SHR1(5/6)}$	0,11	0,33
SHR2	37,3 (21,6; 105,4)	627,6 (383,8; 688,9)
SHR2(3/4)	79,6 (12,6; 139,8)	710,4 (631,7; 740,0)
SHR2(5/6)	95,4 (80,3; 123,1)	767,6 (701,2; 889,9)
$p_{SHR2-SHR2(3/4)}$	0,62	0,12
$p_{SHR2-SHR2(5/6)}$	0,11	0,011
$p_{SHR2(3/4)-SHR2(5/6)}$	0,35	0,27

Концентрация FGF23 достоверно повышалась в моделях с более продолжительным сроком повреждающего воздействия – W2(3/4) и в модели SHR2(5/6), соответствующих наиболее позднему из реализуемых стадий (таблица 5), и была ассоциирована с концентрацией sP_i ($r=0,38$, $p=0,021$). Вероятно, при начальном снижении функции почек поддержание нейтрального баланса P_i осуществляется иными факторами, в то время как FGF23 участвует в регуляции метаболизма P_i на более поздних стадиях ХБП.

Экспрессия белка Klotho и рецептора FGFR1 в почке при моделировании ХБП.

Согласно результатам морфометрического исследования, содержание ренального белка Klotho значительно снижалось, начиная с моделей раннего

повреждения почек (таблица 6). У крыс группы W2(3/4) экспрессия Klotho в почке была достоверно ниже, чем в контрольной группе W2. У крыс линии SHR, стратифицированных по выраженности повреждения почек, уровень ренального Klotho в группах достоверно снижался по мере роста повреждающего воздействия (таблица 6).

При сравнении групп попарно значительное снижение ренальной экспрессии белка Klotho наблюдали, начиная с модели наиболее раннего повреждения почек SHR2 по сравнению с контролем SHR1 ($p=0,015$, таблица 3). Содержание FGFR1 в коре почки крыс достоверно не различалось, как при сравнении попарно групп с разными сроками эксперимента и повреждающим воздействием (таблица 6), так и при оценке изменения уровня FGFR1 в группах, стратифицированных по тяжести хронического повреждения почек ($p=0,31$).

Таблица 6 – Экспрессия белков Klotho и FGFR1 в тубулоинтерстиции при моделировании хронического повреждения почек у крыс (M±SD)

Модель, p	Klotho, доля S ² продукта от S ² ТИ	FGFR1, доля S ² продукта от S ² ТИ
W2	0,339±0,061	0,498±0,052
W2(3/4)	0,213±0,081	0,501±0,049
<i>p_{W2-W2(3/4)}</i>	0,002	0,65
SHR1	0,315±0,066	0,487±0,061
SHR1(3/4)	0,244±0,048	0,499±0,032
SHR1(5/6)	0,199±0,051	0,471±0,054
<i>p_{SHR1-SHR1(3/4)}</i>	0,018	0,59
<i>p_{SHR1-SHR1(5/6)}</i>	<0,001	0,75
<i>p_{SHR1(3/4)-SHR1(5/6)}</i>	0,13	0,66
SHR2	0,224±0,077	0,460±0,057
SHR2(3/4)	0,214±0,030	0,466±0,049
SHR2(5/6)	0,134±0,024	0,470±0,062
<i>p_{SHR2-SHR2(3/4)}</i>	0,71	0,46
<i>p_{SHR2-SHR2(5/6)}</i>	0,007	0,73
<i>p_{SHR2(3/4)-SHR2(5/6)}</i>	<0,001	0,65

ТИ – тубулоинтерстиций

Корреляционный анализ взаимосвязи уровня ренального Klotho с рутинными лабораторными параметрами функции почек и метаболизма Pi, показал, что экспрессия Klotho снижается по мере прогрессирования хронического повреждения. Содержание белка Klotho в почке обратно коррелировало с концентрацией мочевины ($r=-0,60$, $p=0,034$) и креатинина ($r=-0,58$, $p=0,025$) в сыворотке крови. Помимо этого, уровень Klotho был обратно ассоциирован с выраженностью фиброза тубулоинтерстиция ($r=-0,48$, $p=0,032$).

Множественный регрессионный анализ позволил установить, что $FEPI$ в большей степени связана с уровнем белка *Klotho* в почке ($\beta=-0,36\pm 0,11$; $p=0,002$), несмотря на включение в качестве зависимых переменных других факторов – *FGF23* ($\beta=0,25\pm 0,11$; $p=0,034$), *PTH* ($\beta=0,12\pm 0,10$; $p=0,15$) и *FGFR1* ($\beta=0,15\pm 0,11$; $p=0,19$).

На данном этапе исследования было установлено, что статистически значимое снижение уровня *Klotho* происходит на ранних стадиях хронического повреждения почек, когда ренальная экспрессия рецептора *FGFR1*, концентрации интактного *FGF23* и интактного *PTH* не изменяются. Редукция *Klotho* происходит одновременно с ростом экскреции Pi и ассоциирована с прогрессированием хронического повреждения почек, снижением их функции и фиброзом тубулоинтерстиция.

Klotho/FGF23 и гипертрофия миокарда в моделях ХБП. При разных сроках эксперимента у крыс SHR отмечен закономерный рост артериального давления (АД) и существенное увеличение индекса массы миокарда (ИММ) в группах с НЭ по сравнению с ЛО животными (таблицы 7, 8).

Таблица 7 – Систолическое кровяное давление и индекс массы миокарда у крыс SHR при сроке эксперимента один месяц ($M\pm SD$)

Измеряемый параметр	Модель, р				
	SHR1	SHR1(3/4)	SHR1(5/6)	$P_{SHR1-SHR1(3/4)}$	$P_{SHR1-SHR1(5/6)}$
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	196±9	197±9	205±9	0,80	0,039
Индекс массы миокарда, мг/г	4,00±0,29	4,29±0,21	4,61±0,33	0,028	0,001

Таблица 8 – Систолическое кровяное давление и индекс массы миокарда у крыс SHR при сроке эксперимента два месяца ($M\pm SD$)

Измеряемый параметр	Модель, р				
	SHR2	SHR2(3/4)	SHR2(5/6)	$P_{SHR2-SHR2(3/4)}$	$P_{SHR2-SHR2(5/6)}$
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	190±10	204±17	210±10	0,043	0,001
Индекс массы миокарда, мг/г	4,19±0,07	4,41±0,29	4,61±0,25	0,044	<0,001

При анализе объединенной группы экспериментальных животных была выявлена значимая обратная корреляция между ИММ и содержанием *Klotho* в тубулярном эпителии почки (рисунок 2).

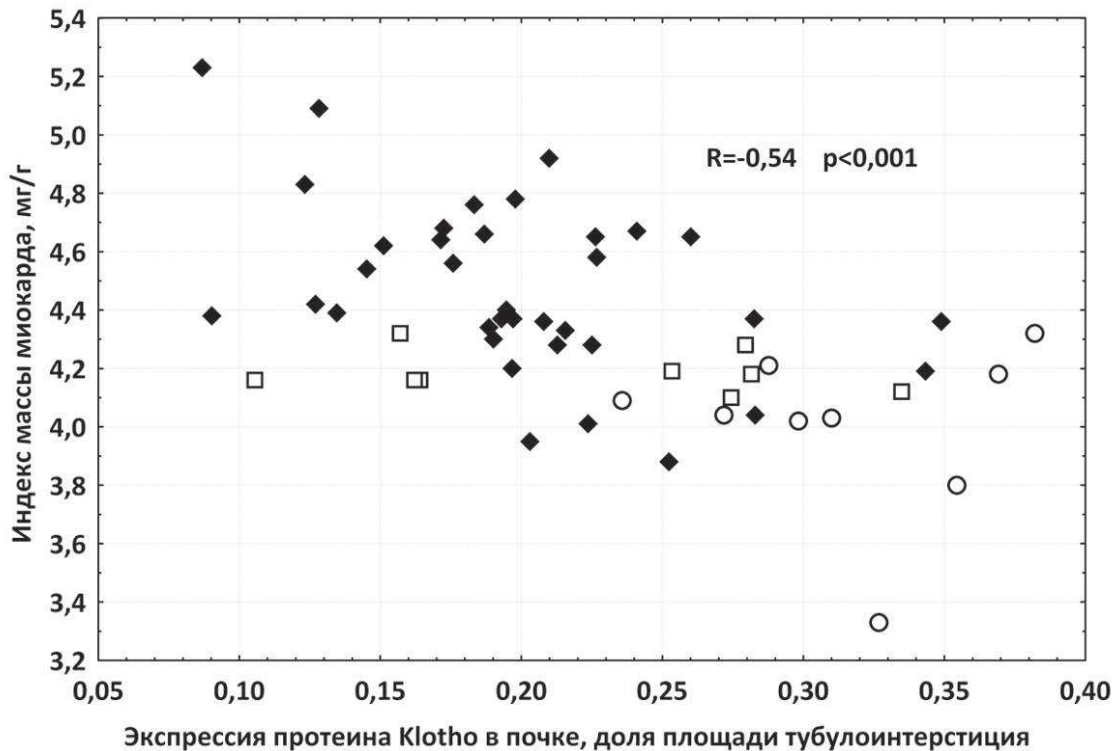


Рисунок 2 – Взаимосвязь между индексом массы миокарда и уровнем ренального Klotho у крыс SHR

Указан коэффициент корреляции для объединенной группы крыс SHR (n=54); круги — контрольная группа SHR1; белые квадраты — модель SHR2; черные ромбы — объединенная группа крыс, подвергнутых НЭ.

При использовании мультивариантного пошагового регрессионного моделирования содержание Klotho в почке сохраняло статистически значимую связь с ИММ ($p=0,012-0,018$), несмотря на включение в модели в качестве независимых переменных других факторов, потенциально способных влиять на развитие гипертрофии миокарда, включая значения АД, FGF23 и PTH, sCr, FERi, uPi24, sPi, суточную потерю белка. Выявленная связь между ренальным Klotho и индексом массы миокарда позволяет предполагать участие данного белка в механизмах ремоделирования сердечной мышцы при хроническом повреждении почек.

Клиническое исследование

Биохимические показатели обмена неорганического фосфата у пациентов с начальными стадиями ХБП. Средние значения Pi в сыворотке крови пациентов находились в пределах принятой нормы (0,83-1,48 ммоль/л). Достоверных различий концентрации Pi в сыворотке (рисунок 3а) и абсолютной экскреции Pi почками (рисунок 3б) в группах, стратифицированных по рСКФ, выявлено не было, в то время как рост фракционной экскреции Pi происходил при начальном снижении функции почек в группе пациентов с рСКФ 99-70 мл/мин/1,73 м² (рисунок 3в). Значительное повышение FERi, способствующее поддержанию уровня uPi24 и

Pi сыворотки при начальном снижении функции почек, может свидетельствовать о ранней активации механизмов регуляции гомеостаза Pi в ответ на формирующуюся ретенцию Pi.

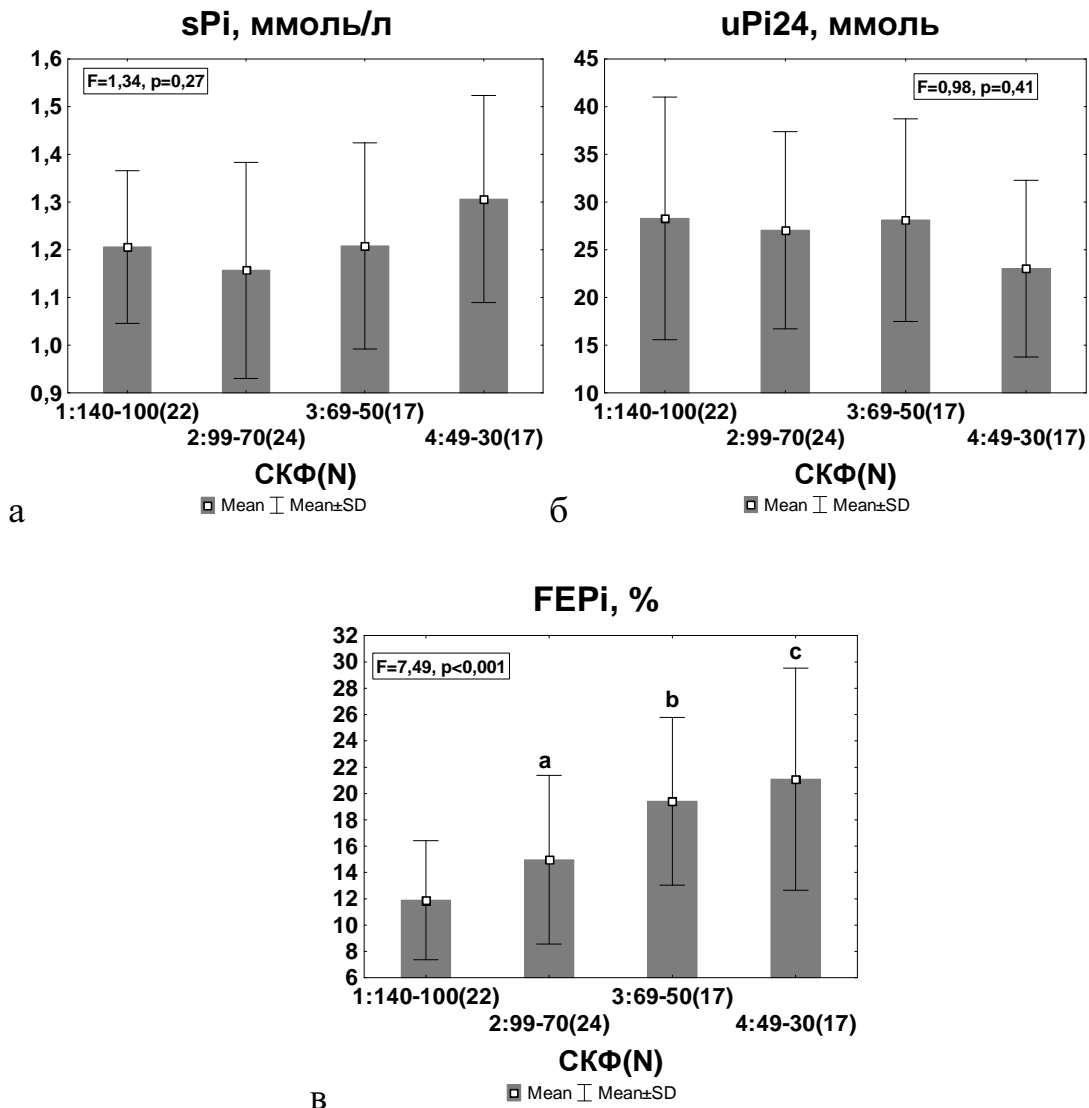


Рисунок 3 – Показатели метаболизма Pi в группах пациентов, стратифицированных по pСКФ (M±SD): а – концентрация Pi в сыворотке; б – абсолютная экскреция Pi (uPi24); в – относительная экскреция Pi (FERi). По оси абсцисс указан диапазон расчетной СКФ и в скобках число наблюдений в группе; а – $p_{1-2}=0,046$; б – $p_{1-3}<0,001$, $p_{2-3}=0,028$; в – $p_{1-4}<0,001$, $p_{2-4}=0,009$, $p_{3-4}=0,49$.

Белок Klotho, концентрации интактных FGF23 и PTH на ранних стадиях ХБП. По мере прогрессирования дисфункции почек наблюдали снижение содержания Klotho в тубулоэпителии (рисунок 4а). Площадь экспрессии Klotho была достоверно ниже в группе 2 ($p=0,036$) и объединенной группе 3-4 ($p=0,015$) в сравнении с группой 1 (рисунок 4а). Концентрация Klotho в сыворотке была ниже в объединенной группе 3 и 4 (СКФ 69-30 мл/мин/1,73 м²) в сравнении с группой 1 (рисунок 4б). Концентрация Klotho в

моче достоверно не различалась в исследуемых группах ($p=0,10$). Концентрация Klotho в сыворотке имела обратную зависимость от выраженности патоморфологических изменений паренхимы почки: атрофии канальцев ($r=-0,44$, $p=0,037$), очагового интерстициального фиброза ($r=-0,43$, $p=0,025$) и индекса гломерулярного склероза ($r=-0,45$, $p=0,015$).

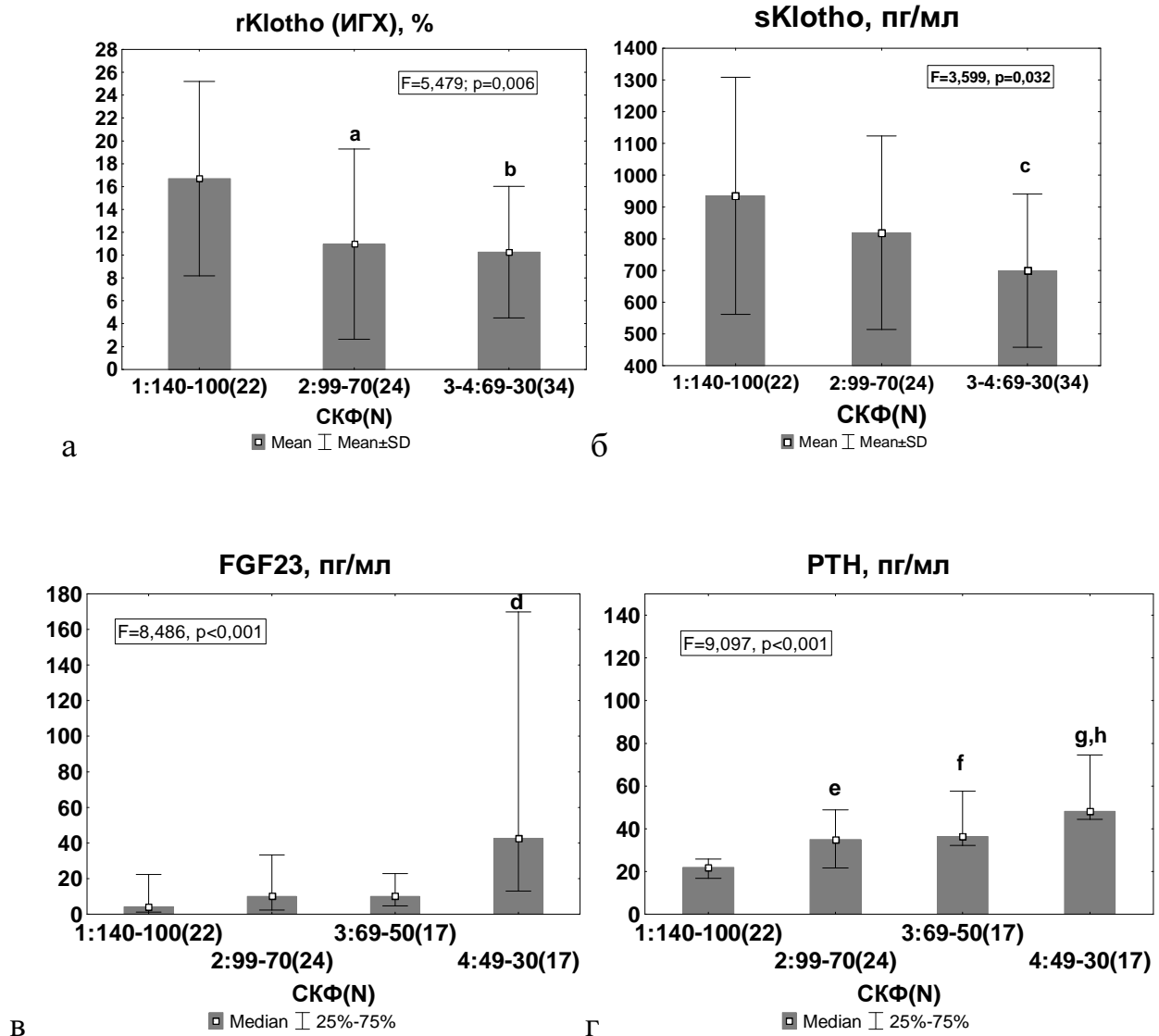


Рисунок 4 – Белок Klotho в почке и сыворотке крови, концентрации интактных FGF23 и PTH в группах пациентов, стратифицированных по рСКФ: а – относительная площадь экспрессии Klotho в почке (rKlotho); б – концентрация Klotho в сыворотке (sKlotho); в – концентрация FGF23 в сыворотке; г – концентрации PTH в сыворотке. По оси абсцисс указан диапазон рСКФ и число наблюдений в группе (в скобках); а – $p=0,036$, б – $p=0,015$, в – $p=0,041$ 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.

Концентрации FGF23 в группах 1, 2, 3 находились в пределах нормы (8,2-54,3 пг/мл; Yamashita H. et al., 2005) и значимо не различались (рисунок 4 в). В группе 4 (рСКФ 49-30 мл/мин/1,73 м²) концентрация FGF23 была достоверно выше по сравнению с группами 1, 2, 3 (p<0,034). Средние концентрации РТН находились в пределах нормальных значений (12-88 пг/мл). При сравнении групп попарно выявлено достоверное увеличение концентрации РТН при снижении рСКФ, начиная с группы 2 (рисунок 4 г).

Концентрация Pi в сыворотке крови пациентов прямо коррелировала с FGF23 (r=0,52; p<0,001) и РТН (r=0,25; p=0,023), относительная экскреция фосфата (FE_{Pi}) прямо – с концентрациями FGF23 (r=0,40; p<0,001), РТН (r=0,62; p<0,001), и обратно – с содержанием Klotho в тубулоинтерстиции (r=-0,27; p=0,015); абсолютная экскреция Pi (uPi24) прямо коррелировала с Klotho в моче (r=0,31; p=0,015). Множественный линейный регрессионный анализ позволил установить, что концентрация Klotho в моче ассоциирована с абсолютной экскрецией Pi, несмотря на включение в модель в качестве независимых переменных FGF23 и РТН (таблица 9); концентрация Klotho в сыворотке независимо ассоциирована с индексом гломерулярного склероза (ИГС) (β=-0,30; p=0,018) и тубулоинтерстициальными изменениями (ТИИ) (β=-0,30; p=0,034); концентрации FGF23 и РТН, не связаны с концентрацией Klotho в сыворотке, моче и экспрессией Klotho в почке. Независимыми предикторами роста концентрации FGF23 были Pi сыворотки (β=0,37; p=0,003) и РТН (β=0,35; p=0,011), концентрации РТН – рСКФ (β=-0,41; p=0,032) и FGF23 (β=-0,41; p=0,011). Рост концентрации Pi сыворотки был независимо ассоциирован с ростом концентрации интактного FGF23; увеличение уровня относительной экскреции Pi (FE_{Pi}) было связано с РТН (таблица 9).

Таблица 9 – Множественный регрессионный анализ связей между исследуемыми переменными* и базовыми показателями метаболизма Pi (приведены только достоверные значения коэффициента β при p<0,05)

Зависимые переменные	Независимые переменные					
	Пол	рСКФ	sPi	uKlotho	FGF23	РТН
sPi	-	-	н/п	-	0,50 0,007	-
uPi24	0,30 0,002	0,33 0,034	-0,25 0,022	0,34 0,019	-	-
FE _{Pi}	0,25 0,023	-	-	-	-	0,43 0,003

*В качестве независимых переменных в моделях также были использованы: возраст, содержание Klotho в тубулоинтерстиции, Klotho в сыворотке, индекс гломерулярного склероза, тубулоинтерстициальные изменения; знак «-» – указывает на отсутствие связи, «н/п» – параметр не был применен в модели.

Диагностическая значимость определения уровня Klotho при выявлении патологических изменений морфологии нефробиоптата. Согласно результатам исследования, концентрация Klotho в сыворотке ассоциирована с выраженностью дистрофических изменений гломерул и тубулоинтерстиция почки, в связи с чем, был проведен анализ чувствительности и специфичности определения Klotho при оценке тубулоинтерстициальных изменений и гломерулярного склероза нефробиоптата (рисунок 5).

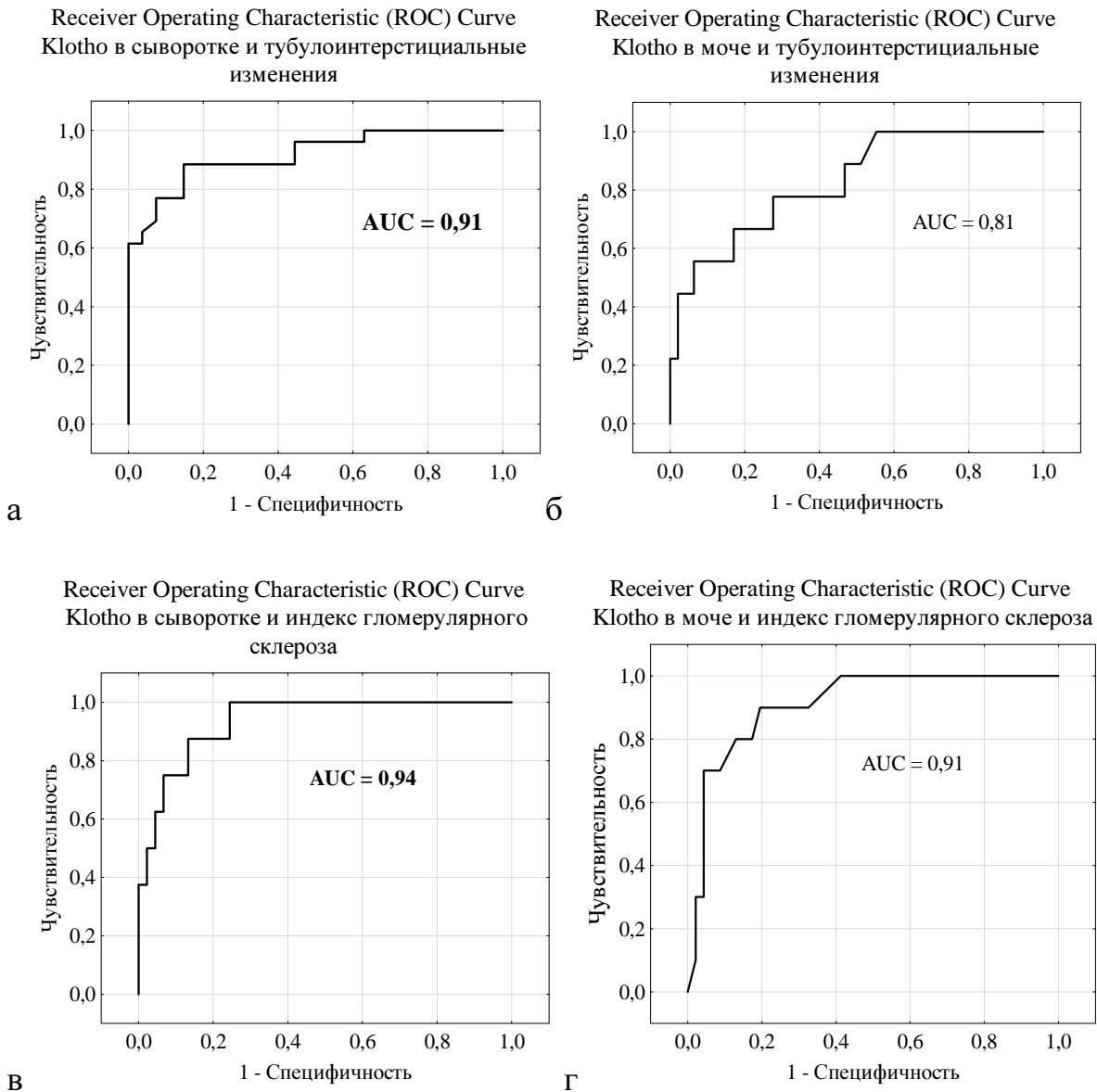


Рисунок 5 – ROC кривые для уровней Klotho в крови (а), моче (б) при оценке выраженности тубулоинтерстициальных изменений; для уровней Klotho в крови (в), моче (г) при оценке склероза клубочков.

Тубулоинтерстициальные изменения (ТИИ) оценивали суммарно в баллах. В качестве нормы принимали значения коэффициента ТИИ от одного до трех баллов включительно, патологии – более 3 баллов. Анализ ROC кривых показал, что при выявлении тубулоинтерстициального повреждения содержание Klotho в почке является хорошим классификатором, площадь под

кривой (AUC) составила 0,78 (пороговый уровень (ПУ)=19,3%). Klotho в крови или моче при выявлении ГИИ являются отличными классификаторами – $AUC_{\text{Klotho в крови}} = 0,91$; ПУ=1057 пг/мл, $AUC_{\text{Klotho в моче}} = 0,81$; ПУ=20,8 пг/мл.

При выявлении выраженности суммарных склеротических изменений клубочков в качестве нормальных допускали значения ИГС меньше 10 % включительно, патологическими считали значения ИГС более 10 %. В данном случае все три показателя – концентрация Klotho в крови ($AUC=0,94$; ПУ=1064 пг/мл), моче ($AUC=0,91$; ПУ=18,0 пг/мл), содержание Klotho в почке ($AUC=0,87$, ПУ=18,8%), являются отличными классификаторами.

ВЫВОДЫ

1. Ренальная экскреция P_i значительно повышается на самых ранних стадиях экспериментального повреждения почек и ХБП, что свидетельствует о раннем изменении метаболизма P_i .

2. В экспериментальных моделях на ранних стадиях дисфункции почек происходит снижение уровня тубулярного Klotho при отсутствии изменений ренальной экспрессии рецептора FGFR1; у пациентов с протеинурическими нефропатиями снижение белка Klotho в почке происходит при $pCKФ < 100$ мл/мин/1,73 м², в циркуляции – при $pCKФ < 70$ мл/мин/1,73 м².

3. В экспериментальном и клиническом исследованиях доказана ассоциация между снижением уровня Klotho и фибропластическими изменениями почки; у пациентов с ХБП Klotho является информативным диагностическим маркером гломерулосклероза и фиброза тубулоинтерстиция.

4. В экспериментальном исследовании доказано, что уровень ренального Klotho ассоциирован с гипертрофией миокарда независимо от других факторов сердечно-сосудистого риска, таких как артериальное давление, P_i , РТН, FGF23.

5. В экспериментальном и клиническом исследованиях хронической дисфункции почек снижение уровня Klotho значительно предшествует росту концентрации FGF23, при этом увеличение фракционной экскреции P_i с мочой на ранних стадиях ХБП происходит независимо от FGF23, циркулирующего и ренального Klotho.

6. Рост концентрации FGF23 в плазме происходит на более поздних стадиях клинической и экспериментальной дисфункции почек, не является причиной органной резистентности к действию FGF23 в условиях системного дефицита Klotho и ассоциирован с увеличением неорганического фосфата в циркуляции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, терапевтов и нефрологов.

1. Поскольку изменение экскреции неорганического фосфата почками происходит на начальных стадиях ХБП и связано с формированием его системного дисбаланса, у пациентов целесообразно дополнять рутинное

исследование концентрации неорганического фосфата в крови оценкой (расчетом индексов) его почечной экскреции.

2. У пациентов с ХБП, начиная с третьей стадии, следует мониторировать концентрацию интактного FGF23 как предиктора роста сывороточного пула неорганического фосфата, отражающего изменения минерального обмена в скелете и являющегося фактором риска сердечнососудистых осложнений. Высокие концентрации FGF23 (>54,3 пг/мл) связаны с формирующимся дисбалансом фосфатного метаболизма и развитием гиперфосфатемии.

3. Белок Klotho является ранним биомаркером суммарных склеротических изменений почки – гломерулярного склероза, атрофии канальцев и интерстициального фиброза. У пациентов с ХБП, начиная с первой стадии, целесообразно оценивать уровень Klotho, поскольку низкие концентрации Klotho в крови (<1060,0 пг/мл) связаны с патологическими изменениями морфологии почки.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные методические подходы позволяют осуществлять поиск пациентов группы риска развития системного дисбаланса P_i и минеральных и костных нарушений, а также проводить оценку прогрессирования склеротических изменений почки - склероза клубочков и фиброза тубулоинтерстиция, для повышения эффективности терапии у пациентов с ХБП.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящий в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ

1. Добронравов, В.А. Патогенез нарушений обмена фосфатов при хронической болезни почек: всё ли так ясно, как кажется? / В.А. Добронравов, **Е.О. Богданова** // Нефрология. – 2014. – № 2(18). – С. 42-46.

2. Добронравов, В.А. Почечная экспрессия белка αKlotho, фактор роста фибробластов 23 и паратиреоидный гормон при экспериментальном моделировании ранних стадий хронического повреждения почек / В.А. Добронравов, **Е.О. Богданова**, Н.Ю. Семенова, О.Н. Береснева, О.В. Галкина, И.М. Зубина, Е.Е. Зуева, И.Г. Каюков, Т.Л. Коваленко, Л.В. Котенко, М.М. Парастаева, В.Г. Сиповский, А.В. Смирнов, Г.Т. Иванова, Г.М. Нитфуллина, В.А. Цинзерлинг // Нефрология. – 2014. – № 2(18). – С. 72-78.

3. **Богданова, Е. О.** Почечная экспрессия белка αKlotho ассоциирована с гипертрофией миокарда (экспериментальное исследование) / **Е.О. Богданова**, О.Н. Береснева, Н.Ю. Семенова, М.М. Парастаева, Г.Т. Иванова, О.В. Галкина, И.М. Зубина, И.Г. Каюков, Т.Л. Коваленко, Л.В. Котенко, В.А. Добронравов // Артериальная гипертензия. – 2014. – № 6(20). – С. 522-530.

4. **Богданова, Е.О.** Klotho, фактор роста фибробластов 23 и неорганический фосфат на ранних стадиях хронической болезни почек / **Е.О. Богданова, О.В. Галкина, И.М. Зубина, В.А. Добронравов**// Нефрология. – 2016. – №4(20). – С. 61-67.

5. **Богданова, Е.О.** Протеины мочи и фибропластические изменения компартментов почки при иммунных гломерулопатиях / **Е.О. Богданова, О.В. Галкина, И.М. Зубина, В.А. Добронравов** // Нефрология. – 2017. – № 6(21). – С. 54-59.

Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

6. **Богданова, Е.О.** Фактор роста фибробластов 23 и α Klotho в экспериментальных моделях ранних стадий хронического повреждения почек / **Е.О. Богданова, В.А. Добронравов** // Клинико-лабораторный консилиум. – 2014. – №2(49). – С.16.

7. **Богданова, Е.О.** Регуляция метаболизма неорганического фосфата на ранних стадиях хронической болезни почек / **Е.О. Богданова, В.А. Добронравов, Е.Е. Зуева, О.В. Галкина** // Сборник тезисов II Международного симпозиума, посвященного дню ДНК «Современные биотехнологии для науки и практики». – 2015. – С.13-14.

8. **Богданова, Е.О.** Фактор роста фибробластов 23, белок Klotho и паратиреоидный гормон при 3/4 нефрэктомии у крыс Вистар / **Е.О. Богданова, В.А. Добронравов, О.В. Галкина, О.Н. Береснева, И.М. Зубина** // Сборник тезисов II Международного симпозиума, посвященного дню ДНК «Современные биотехнологии для науки и практики». – 2015. – С.14-15.

9. Береснева, О.Н. Почечная экспрессия белка α Klotho ассоциирована с гипертрофией миокарда / **О.Н. Береснева, М.М. Парастаева, Е.О. Богданова, Г.Т. Иванова, О.В. Галкина, И.Г. Каюков, В.А. Добронравов** // Мультидисциплинарные аспекты молекулярной медицины: сборник материалов 3-го Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». – 2015. – С. 48-50.

10. Beresneva, O. Renal α Klotho expression is associated with myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats / **O. Beresneva, M. Parastaeva, E. Bogdanova, G. Ivanova, O. Galkina, I. Kayukov, V. Dobronravov** // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2015. – Issue suppl 3 (V.30). – P. 73.

11. **Bogdanova, E.** α Klotho and fibroblast growth factor 23 are not associated with the decrease of tubular phosphate reabsorption in early CKD: experimental and clinical study / **E. Bogdanova, N. Semenova, O. Galkina, I. Zubina, V. Sipovskii, O. Beresneva, G. Ivanova, M. Parastaeval and V. Dobronravov** // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2016. – Supplement 1. – P.454–471.

12. **Bogdanova, E.** Serum alpha-Klotho is associated with pathological changes in renal tissue in patients with stages 1-3 CKD / **E. Bogdanova, O. Galkina, N. Semenova, I. Zubina, V. Sipovskii and A. Smirnov** // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2017. – 32 (Issue suppl 3). – P.546–547.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1,25(OH)2D3 – кальцитриол	uPi – неорганический фосфат в моче
Cr – креатинин	uPi24 – абсолютная экскреция неорганического фосфата почками
FE _{Pi} – относительная экскреция неорганического фосфата	Ur – мочевины в крови
FGF23 – фактор роста фибробластов 23	АД – артериальное давление
FGFR – рецептор фактора роста фибробластов	АК – атрофия канальцев
IGF-I – инсулиноподобный фактор роста I типа	ВДК – вакуольная дистрофия канальцев
NPT-2a, b, c – натрий-зависимый фосфатный транспортер 2a, 2b, 2c	ГДК – гиалиново-капельная дистрофия канальцев
Pi – неорганический фосфат	ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка
PTH – паратиреоидный гормон	ГМ – гипертрофия миокарда
ROMK – внешний медулярный калиевый канал почек	ЗДК – зернистая дистрофия канальцев
SHR – спонтанно гипертензивные крысы	ИГС – индекс гломерулярного склероза
sCa – кальций в сыворотке крови	ИММ – индекс массы миокарда
sCr – креатинин в сыворотке крови	НЭ – нефрэктомия
sPi – неорганический фосфат в сыворотке	ОИФ – очаговый интерстициальный фиброз
TRPV5 – транзиторный рецепторный катионный канал V 5 типа	рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации
uCa – кальций в моче	ТИИ – тубулоинтерстициальные изменения
uCr – креатинин в моче	ХБП – хроническая болезнь почек
	ЩФ – общая щелочная фосфатаза

Подписано в печать __ . __ .2018.
Тираж 100 экз. Формат 60x90/16
Цифровая печать Печ. л. 1,0

Отпечатано в ООО «ОQ Копицентр»
197022, г. Санкт-Петербург,
Каменноостровский пр., д. 42