

Мельник А.А.

Специализированный медицинский центр «Оптима-фарм», г. Киев, Украина

Белок Klotho и фактор роста фибробластов FGF23 как маркеры хронической болезни почек

For cite: Pochki. 2017;6:132-8. doi: 10.22141/2307-1257.6.3.2017.109027

Резюме. Хроническая болезнь почек (ХБП) является глобальной проблемой общественного здравоохранения в мире. Исследования ученых направлены на поиски новых биомаркеров ХБП. Такими биомаркерами являются растворимый белок α -Klotho и фактор роста фибробластов FGF23. Показано, что экспрессия белка Klotho уменьшается параллельно с прогрессированием ХБП и достигает низких или неопределяемых значений в терминальной стадии заболевания почек. В отличие от Klotho фактор роста фибробластов FGF23 повышается на ранних стадиях ХБП и служит предиктором неблагоприятного клинического исхода. Уровни белка Klotho и FGF23 являются ранними, чувствительными и специфичными биомаркерами при ХБП и имеют диагностическую ценность для прогнозирования осложнений при заболевании почек.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек; белок α -Klotho; фактор роста фибробластов FGF23; метод ELISA

Неинфекционные заболевания, к которым относится хроническая болезнь почек (ХБП), являются наиболее распространенными причинами заболеваемости и преждевременной смерти. ХБП считается глобальной проблемой общественного здравоохранения в мире. Широкая распространенность ХБП среди населения (более 10 %) приводит к утрате трудоспособности, сердечно-сосудистым осложнениям и смертности из-за развития терминальной почечной недостаточности [1, 2]. В последние годы внимание исследователей привлечено к новым биомаркерам ХБП. Этими маркерами являются белок Klotho и фактор роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor — FGF23), которые принимают участие в метаболизме фосфата, кальция и витамина D при ХБП.

Белок Klotho

Ген белка Klotho был идентифицирован Kuro-o и др. [3] в 1997 г. при изучении трансгенных мышей, экспрессирующих натрий-протонный обменник. Японскими исследователями случайно был поврежден локус соседнего гена, и мыши (Klotho $-/-$) показали поразительный феномен, напоминающий

старение человека, что проявлялось замедлением роста, гипогонадизмом, атрофией кожи, тимуса, кальцификацией сосудов и мягких тканей, остеопорозом, легочной эмфиземой и короткой продолжительностью жизни. Наоборот, избыточная экспрессия Klotho у мышей приводила к увеличению продолжительности жизни. Поэтому Klotho считается антивозрастным геном [4] (рис. 1).

Название гена Klotho происходит от греческой богини Клото (дочери Зевса). В греческой мифологии богини Клото, Лахесис и Атропос, контролируют нить жизни, определяют, какой будет длительность жизни каждого смертного. При этом они соответственно пряли, измеряли и обрезали нити жизни. Белок Klotho имеет молекулярный вес ~ 130 кДа и состоит из 1014 аминокислот, имеет сигнальную последовательность на N-конце и трансмембранный домен с коротким цитоплазматическим доменом на C-конце. Внеклеточный домен Klotho состоит из 2 внутренних повторов (KL1 and KL2) гомологичных последовательностей β -глюкозидазы [5] (рис. 2).

В геноме млекопитающих идентифицировали 3 члена семейства Klotho, являющихся трансмембранными белками различной длины (рис. 3). Рас-

творимые формы α -Klotho могут быть получены протеолитическим расщеплением трансмембранной формы β -секретазы.

Белок Klotho экспрессируется во многих тканях, но особенно в больших количествах в почках. Выраженная экспрессия Klotho обнаружена в дистальных и проксимальных канальцах почек, а также в эпителиальных клетках паращитовидных желез [6]. Мембранная форма является корцептором для FGF23, индуцирует отрицательный фосфатный баланс путем стимулирования экскреции почечного фосфата и снижения уровня сывороточного дигидроксивитамина D₃ (1,25(OH)₂VD₃). Кроме мембранной формы, существует экстрацеллюлярная форма белка Klotho, которая образуется посредством секретазы, а также сплайсинга и высвобождается во внеклеточное пространство, где функционирует как эндокринный фактор. Растворимая форма белка Klotho

играет важную роль в различных процессах организма, включая транспорт ионов, трансдукции сигнала, участвует в регуляции метаболизма кальция, паратиреоидного гормона (PTH) и др. Растворимая форма белка Klotho находится в крови, моче и спинномозговой жидкости [7] (рис. 4).

Функции, физиологические процессы и заболевания, связанные с белком Klotho в организме человека, представлены в табл. 1.

На снижение экспрессии белка Klotho при ХБП/ терминальной стадии почечной недостаточности влияют многие потенциальные факторы, в том числе снижение массы почек, сверхпродуцирование провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей (TNF) и интерферона (INF), дислипидемия и гипергликемия, повышение уремического токсина (индоксил сульфата), окислительный стресс. Дефицит Klotho стимулирует синтез FGF23, уровень которого повышается с увеличением фосфата крови. Высокий уровень FGF23 в крови подавляет синтез 1,25(OH)₂VD₃, что еще больше способствует ингибированию Klotho. Снижение уровня 1,25(OH)₂VD₃ не только уменьшает экспрессию Klotho, но и стимулирует ренин-ангиотензиновую систему, которая подавляет продуцирование Klotho, что приводит к уменьшению экскреции фосфата с мочой (рис. 5).

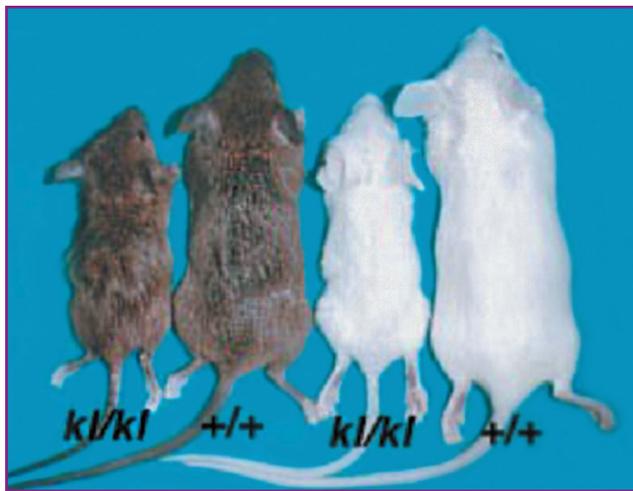


Рисунок 1. Мыши Klotho (-/-) и Klotho (+/+)

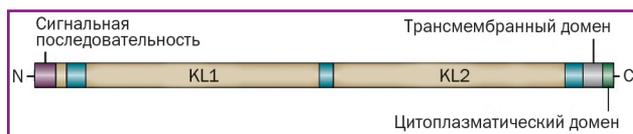


Рисунок 2. Схема структуры белка Klotho

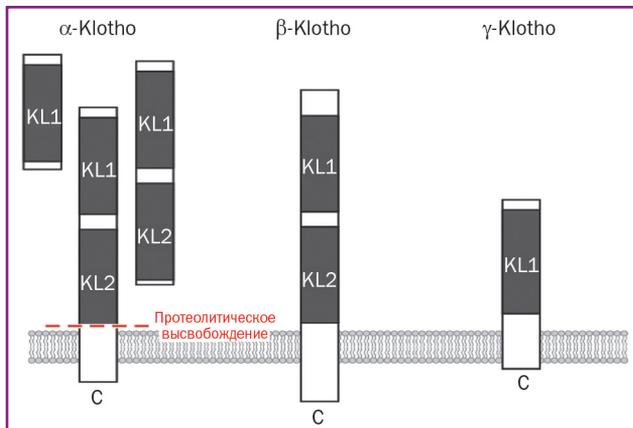


Рисунок 3. Семейство белков Klotho (α -Klotho, β -Klotho и γ -Klotho)

Факторы роста фибробластов

Факторы роста фибробластов представляют собой большое суперсемейство пептидов, которые оказывают плеiotропное воздействие на широкий диапазон биологических процессов, включая эмбриональное развитие, органогенез и метаболизм веществ через связывание и активацию FGF-рецептора (FGFR) [9, 10]. Факторы роста фибробластов продуцируются фибробластами, хон-

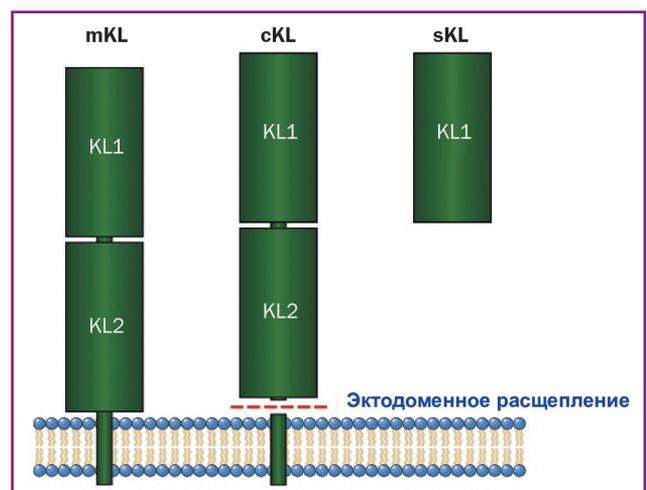


Рисунок 4. Мембраносвязанный Klotho (mKL) может быть расщеплен на поверхности клетки секретазы с образованием растворимого Klotho (cKL). Другая форма растворимого Klotho (sKL) образуется посредством альтернативного сплайсинга экзон 3

дрочитами, кератиноцитами, эндотелиальными, гладкомышечными, тучными, глиальными клетками и стимулируют их пролиферацию. У человека идентифицировано 22 члена фактора роста фибробластов, состоящие из 7 субсемейств (рис. 6).

Субсемейство FGF19 состоит из FGF19, FGF21 и FGF23 [10]. Эти факторы роста фибробластов оказывают свою специфическую физиологическую активность в регуляции энергии и минерального обмена как эндокринные факторы или гормоны [11]. FGF15/19, FGF21 и FGF23 экспрессируются в основном в тонком кишечнике, печени и костях (рис. 7).

Уникальной структурной особенностью данных эндокринных FGF является отсутствие гепарин-связывающего домена, который присутствует во всех паракринных/аутокринных FGF. Этот гепарин-связывающий домен является важным для функционирования FGF по двум причинам. Во-первых, при связывании гепарин-сульфата (HS) во внеклеточном матриксе он уменьшает секрецию FGF и увеличивает их локальную концентрацию. Во-вторых, HS активирует рецептор GFG для образования комплекса HS : GFG : GFGR (2 : 2 : 2). В эндокринных GFG вместо гепарин-сульфата функционирует белок Klotho.



Рисунок 5. Механизм и патофизиология дефицита белка Klotho при ХБП

FGF23

Ген FGF23 расположен на 12-й хромосоме и состоит из 3 экзонов, кодирующих белок, состоящий из 251 аминокислоты (рис. 8). FGF23 имеет молекулярный вес 32 кДа и продуцируется остеocytes и остеобластами кости.

Белок FGF23 содержит сигнальный пептид, состоящий из 24 аминокислот, 154-аминокислотный N-терминальный пептид и C-терминальный рецептор, состоящий из 73 аминокислот. После отщепления 24-аминокислотной сигнальной последовательности белок ²⁵FGF23²⁵¹ секретируется в кровь. В кровотоке белок GFG23 циркулирует в двух разных формах: полноразмерной зрелой форме — ²⁵FGF23²⁵¹ и более короткой — ²⁵FGF23¹⁷⁹, не обладающей уникальной 73-аминокислотной последовательностью. Активной является только полная форма FGF23, так как C-терминальный домен необходим для вза-

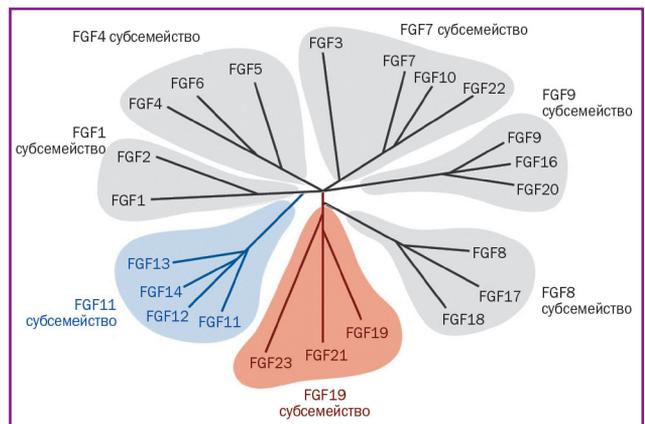


Рисунок 6. Филогенетическое дерево человеческого FGF. Длины ветвей представляют собой эволюционное расстояние между каждым геном (серый цвет — паракрин-/аутокринные субсемейства, голубой цвет — субсемейство FGF11 внутриклеточных медиаторов, которые работают независимо от рецепторов FGF, розовый цвет представляет собой эндокринное субсемейство)

Таблица 1. Функции, физиологические процессы и заболевания, связанные с белком Klotho

Функции	Физиологические процессы	Заболевания
Адипогенез	Контроль артериального давления	Атеросклероз
Ангиогенез	Регулирование минеральной плотности костей	Рак молочной железы
Эффект антистарения	Метаболизм глюкозы	Болезнь коронарных артерий
Антиоксидантный эффект	Регулирование уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности	Ишемический инсульт
Кальциевый обмен		Почечнокаменная болезнь
Кофактор FGF23		Смертность пациентов на гемодиализе
Метаболизм глюкозы		Остеоартрит
Инсулиновая сигнальная система		Рахит
Метаболизм фосфата		Серповидноклеточная анемия
Метаболизм калия		Опухолевый кальциноз

имодействия с кофактором α -Klotho и последующей активацией рецептора FGF [12] (рис. 9).

Рецепторы GFGR (синий цвет) имеют три иммуноглобулиноподобных домена (D1, D2, D3), которые стабилизированы внутренними дисульфидными мостиками. Гепаринсвязывающая область показана фиолетовым цветом. Для эндокринных FGF-лигандов корецептор гепарин-сульфата заменен на Klotho. α -Klotho формирует комплексы с FGFR1c, FGFR3c, FGFR4 и служит в качестве высокоаффинного рецептора для FGF23. Лигандсвязывающая область (зеленый цвет) взаимодействует с С-терминальным концом FGF23. Белок Klotho имеет небольшую внутриклеточную область, тогда как FGFR обладает двумя киназными доменами, которые поддерживают передачу сигнала.

Физиологическая роль FGF23

Основная физиологическая функция FGF23 заключается в регуляции метаболизма фосфата, витамина D и паратиреоидного гормона (PTH). Последствиями избыточного содержания FGF23 являются гипофосфатемия, изменение метаболизма витамина D, нарушение роста и остеомалация [13]. И наоборот, снижение уровня FGF23 приводит к гиперфосфатемии, избытку $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ и кальцификации мягких тканей [14]. В физиологических условиях FGF23 контролирует экскрецию фосфатов почками

в соответствии с потребностями организма. Кроме того, FGF23 влияет на витамин D путем ингибирования $1\text{-}\alpha$ -гидроксилазы, которая превращает $25(\text{OH})\text{D}$ в активную форму $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Увеличение $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ способствует поглощению кальция и фосфата в желудочно-кишечном тракте. Прирост концентрации кальция вместе с $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ влияет на паращитовидную железу. При этом подавляется действие PTH и увеличивается экскреция кальция с мочой.

Белок Klotho как корецептор FGF23

В отличие от большинства факторов роста фибробластов у FGF23 отсутствует гепарин-сульфатсвязывающий центр, поэтому FGF23 имеет низкую аффинность к рецепторам FGF. В 2006 г. группа ученых из Японии идентифицировала mKL как особый кофактор для сигнализации FGF23, позволяющий высокоаффинно связываться с рецепторами FGFR1c, -3c, -4c с последующим активированием пути MAPK (митогенактивированные протеинкиназы) [18] (рис. 10).



Рисунок 8. Структура FGF23

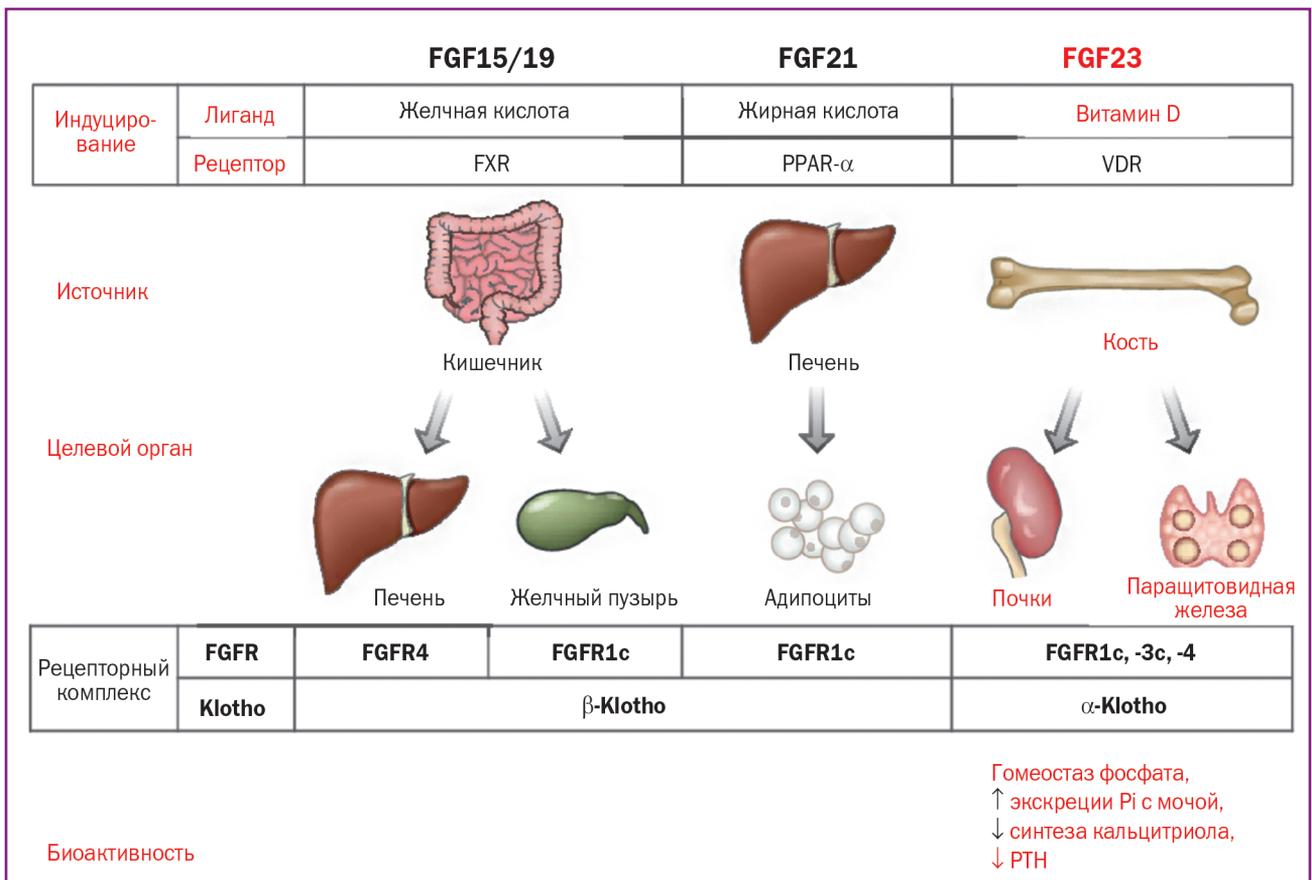


Рисунок 7. Экспрессия FGF15/19, FGF21 и FGF23 из различных органов

Белок Klotho и FGF23 при ХБП

Изменения концентрации белка Klotho (снижение) и FGF23 (повышение) начинаются уже со II–III стадии ХБП и являются более ранними маркерами прогрессирования данного заболевания в отличие от уровней PTH и фосфата [20] (рис. 11).

Определение растворимого белка Klotho и FGF23 применяют для диагностики ХБП. Y. Shimamura и др. показали, что Klotho постепенно снижается на ранних стадиях ХБП с уменьшением скорости клубочковой фильтрации [21]. При этом одновременно происходит увеличение FGF23 [22], а при достижении конечной стадии почечной недостаточности концентрация FGF23 в несколько десятков раз превышает норму [23] (рис. 12).

Методы определения белка Klotho и FGF23

1. Белок Klotho

Коммерчески доступным набором для определения концентрации растворимого белка Klotho является *Human soluble α -Klotho Assay Kit* от компании IBL International GmbH (Германия). В наборе применяется твердофазный сэндвич-метод ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) с использованием двух видов высокоспецифических антител. Определение растворимого α -Klotho осуществляется в сыворотке или плазме, область определения — 93,75–6000 пг/мл, чувствительность — 6,15 пг/мл.

Пример стандартной кривой показан на рис. 13.



Рисунок 9. Комплекс «белок α -Klotho — GFG»

2. FGF23

Для определения концентрации FGF23 используется набор *Human FGF23 ELISA Kit* от компании LifeSpan BioSciences (США). В качестве образцов могут использоваться сыворотка, моча, супернатант культуры клеток, гомогенат клеток. Область

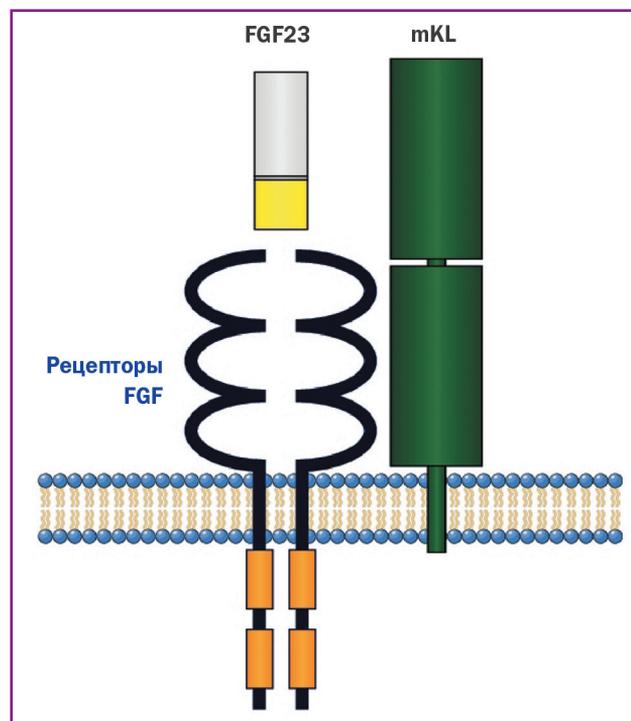


Рисунок 10. Интактный FGF23 связывает рецепторный комплекс, состоящий из белка Klotho и димерного рецептора FGF

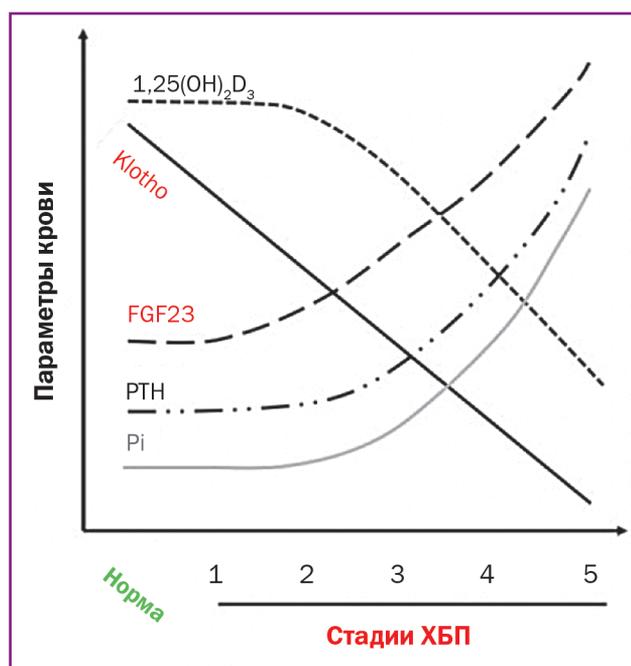


Рисунок 11. Изменение концентрации Klotho и FGF23 при различных стадиях ХБП

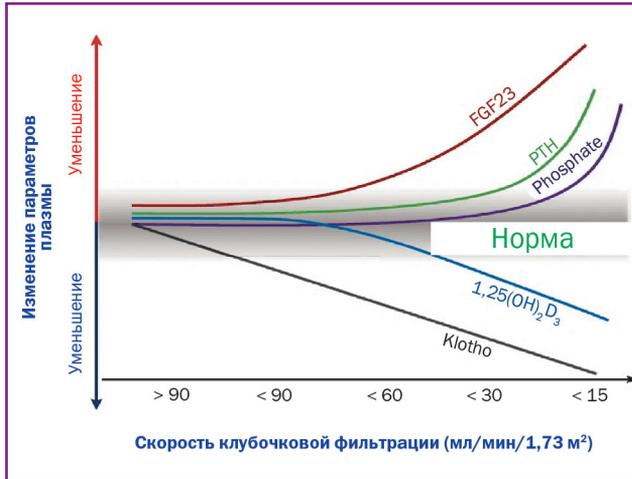


Рисунок 12. Временной профили изменений в крови белка Klotho и FGF23 при ХБП в зависимости от скорости клубочковой фильтрации

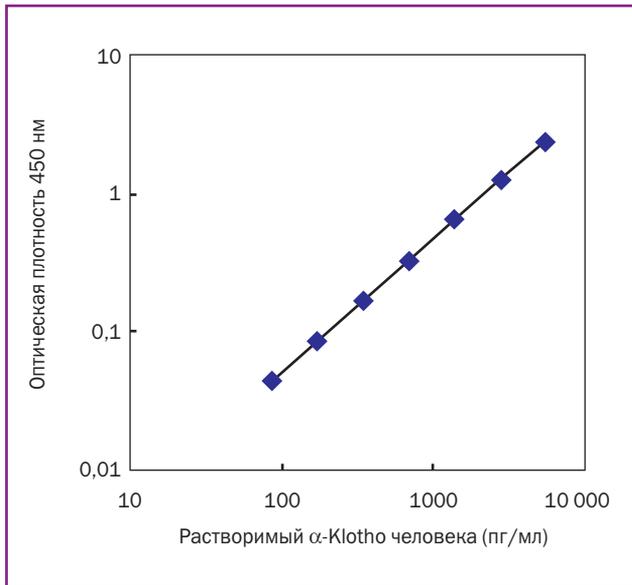


Рисунок 13. Стандартная кривая зависимости концентрации белка Klotho от оптической плотности

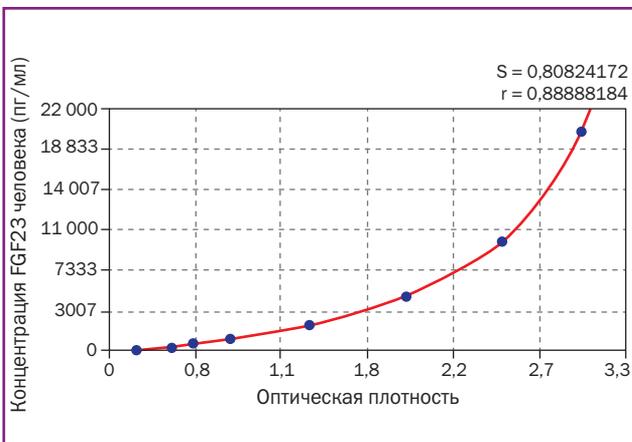


Рисунок 14. График кривой для определения FGF23 в сыворотке крови человека

определения — 3,12–200 пг/мл, чувствительность — 0,78 пг/мл. Типичный график кривой представлен на рис. 14.

Выводы

1. При хронической болезни почек происходят снижение белка Klotho и повышение GFG23.
2. Уровни белка Klotho и FGF23 являются ранними, чувствительными и специфичными диагностическими биомаркерами при хронической болезни почек.
3. Белок Klotho и FGF23 имеют диагностическую ценность для прогнозирования прогрессирования осложнений при заболевании почек.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

References

1. Levey AS, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007;72:247-59. doi:10.1038/sj.ki.5002343.
2. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011 Dec;80(12):1258-70. doi: 10.1038/ki.2011.368.
3. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390(6555):45-51. doi:10.1038/36285.
4. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.* 2005;309:1829-33. doi:10.1126/science.1112766.
5. Nabeshima Y. The discovery of α-Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Oct;65(20):3218-30. doi: 10.1007/s00018-008-8177-0.
6. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Oct 28;414(3):557-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.117.
7. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010 Sep;24(9):3438-50. doi: 10.1096/fj.10-154765.
8. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:139-49. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
9. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):107-37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.008.
10. Beenken A, Mohammadi M. The structural biology of the FGF19 subfamily. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:1-24. doi: 10.1007/978-1-4614-0887-1_1.
11. Kuro-o M. *Endocrine FGFs and Klothos.* Austin, TX/New York: Landes Biosci./Springer. 2012. 233 pp.
12. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, et al. Molecular insights into the klotho dependent, endocrine mode of action of

fibroblast growth factor 19 subfamily members. Mol Cell Biol. 2007;27:3417-28. doi: 10.1128/MCB.02249-06.

13. Fukumoto S, Yamashita T. Fibroblast growth factor-23 is the phosphaturic factor in tumor-induced osteomalacia and may be phosphatonin. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11(4):385-9. PMID: 12105387.

14. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 2004;113(4):561-8. doi: 10.1172/JCI19081.

15. Komaba H, Fukagawa M. FGF23: a key player in mineral and bone disorder in CKD *Nefrologia.* 2009;29(5):392-396. doi:10.3265/Nefrologia.2009.29.5.5400.en.full.

16. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/Klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012;92:131-55. doi: 10.1152/physrev.00002.2011.

17. Memon F, El-Abadi M, Nakatani T. Does Fgf23- klotho activity influence vascular and soft tissue calcification through regulating mineral ion metabolism? *Kidney Int.* 2008 Sep;74(5):566-70. doi: 10.1038/ki.2008.218.

18. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006;444:770-4. doi: 10.1038/nature05315.

19. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, et al. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 2007;117:2684-91. doi: 10.1172/JCI131330.

20. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol.* 2013;180:47-63. doi: 10.1159/000346778.

21. Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, et al. Serum levels of soluble secreted α -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Oct;16(5):722-9. doi: 10.1007/s10157-012-0621-7.

22. Kuro-o M. Klotho in chronic kidney disease — What's new? *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jun;24(6):1705-8. doi: 10.1093/ndt/gfp069.

23. Wolf M. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;82(7):737-47. doi: 10.1038/ki.2012.176.

Получено 12.06.2017 ■

Мельник О.О.

Спеціалізований медичний центр «Оптима-фарм», м. Київ, Україна

Білок Klotho і фактор росту фібробластів FGF23 як маркери хронічної хвороби нирок

Резюме. Хронічна хвороба нирок (ХХН) є глобальною проблемою громадської охорони здоров'я у світі. Дослідження вчених спрямовані на пошуки нових біомаркерів ХХН. Такими біомаркерами є розчинний білок α -Klotho і фактор росту фібробластів FGF23. Показано, що експресія білка Klotho зменшується паралельно з прогресуванням ХХН і досягає низьких або невизначених значень у термінальній стадії захворювання нирок. На відміну від

Klotho фактор росту фібробластів FGF23 підвищується на ранніх стадіях ХХН і служить предиктором несприятливого клінічного результату. Рівні білка Klotho і FGF23 є ранніми, чутливими і специфічними біомаркерами при ХХН і мають діагностичну цінність для прогнозування ускладнень при захворюванні нирок.

Ключові слова: хронічна хвороба нирок; білок α -Klotho; фактор росту фібробластів FGF23; метод ELISA

A.A. Melnik

Specialized Medical Center "Optima-Pharm", Kyiv, Ukraine

Protein Klotho and FGF23 fibroblasts growth factor as markers of chronic renal disease

Abstract. Chronic kidney disease (CKD) is a global public health problem in the world. Research scientists are aimed at finding new biomarkers for CKD. Such biomarkers are α -Klotho soluble protein and fibroblast growth factor (FGF23). It was shown that the expression of Klotho protein decreases progressively as the progression of CKD and reaches low or undetectable values at the terminal stage of kidney disease. Un-

like Klotho, FGF23 fibroblast growth factor increases in the early stages of CKD and serves as a predictor of an unfavorable clinical outcome. Klotho and FGF23 protein levels are early, sensitive and specific diagnostic biomarkers in CKD and are of diagnostic value for predicting complications of kidney disease.

Keywords: chronic kidney disease; α -Klotho protein; FGF23 fibroblast growth factor; ELISA