

# Влияние коррекции анемии на продукцию циркулирующей формы морфогенетического белка $\alpha$ -Klotho у больных с 3Б—4 стадиями хронической болезни почек: новое направление кардионефропротекции

Ю.С. МИЛОВАНОВ, Н.А. МУХИН, Л.В. КОЗЛОВСКАЯ, С.Ю. МИЛОВАНОВА, М.М. МАРКИНА

ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

## Резюме

**Цель исследования.** Изучить влияние коррекции анемии препаратами, стимулирующими эритропоэз, на уровень в сыворотке крови циркулирующей формы морфогенетического белка  $\alpha$ -Klotho у больных хронической болезнью почек (ХБП) 3Б—4 стадии.

**Материалы и методы.** Обследовали 64 больных ХБП недиабетической этиологии 3Б—4 стадии в возрасте  $42 \pm 8$  лет, которых распределили в 2 группы: 1-я — 32 больных с анемией (у 20 с помощью эритропоэтина и железа сахара́та удалось достичь и поддерживать целевой уровень гемоглобина — группа 1А, и 12, которым назначенная терапия не позволила достигнуть целевого уровня гемоглобина — группа 1Б). Группу контроля (2-я) составили 32 больных без анемии, сопоставимых с больными 1-й группы по полу, возрасту и степени снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ). У всех 64 больных во время скрининга и через 1 год после окончания исследования наряду с показателями обмена железа изучена динамика уровня Klotho в сыворотке. Для коррекции анемии 32 пациента с анемией (группы 1А и 1Б) получали эпоэтин короткого действия (рекормон по 2000 ЕД 3 раза в неделю подкожно) + железо (венофер 5 мл 100 мг 1 раз в неделю внутривенно) под контролем уровня гемоглобина, насыщения трансферрина железом и ферритина сыворотки. После достижения целевого уровня гемоглобина 110—120 г/л для его поддержания всем пациентам вместо эпоэтина короткого действия вводили эпоэтин длительного действия дабепоэтин- $\alpha$  1,5 мкг на 1 кг 1 раз в 2 мес подкожно и железа сахара́та 100 мг 1 раз в 2 нед внутривенно.

**Результаты.** Среди 32 больных 1-й группы с анемией у 20 (63%) (группа 1А) терапия эпоэтином- $\beta$  + железа сахара́том позволила достигнуть целевого уровня гемоглобина (110—120 г/л) и поддерживать его в этом диапазоне; у 12 (37%) больных (группа 1Б), несмотря на введение эпоэтина и железа сахара́та, сохранялась анемия (уровень гемоглобина  $< 110$  г/л). У больных группы 1А отмечено увеличение концентрации  $\alpha$ -Klotho в среднем на  $100 \pm 11,6$  пг/мл по сравнению с таковой у больных группы 1Б (только на  $72 \pm 4,2$  пг/мл). В то же время в контрольной группе к концу наблюдения уровень  $\alpha$ -Klotho уменьшился в среднем на  $210 \pm 12,9$  пг/мл по сравнению с таковой до скрининга. Отмечена прямая связь между концентрацией гемоглобина, ферритина в сыворотке крови и процентом насыщения железом трансферрина и уровнем  $\alpha$ -Klotho. Выявлено, что концентрация гемоглобина  $\geq 110$  г/л с чувствительностью 89% и специфичностью 75% позволяет прогнозировать выявление более высокого уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови при ХБП. У тех же больных обнаружена обратная связь между уровнем  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови и риском развития сердечно-сосудистых осложнений.

**Заключение.** Концентрация белка Klotho в сыворотке является не только маркером тяжести ХБП и ее осложнений (анемия, гипертрофия левого желудочка сердца, сердечная недостаточность), но и патогенетическим фактором прогрессирования ХБП. Показана возможность усиления продукции  $\alpha$ -Klotho в почках и внепочечно через коррекцию анемии средствами, стимулирующими эритропоэз.

*Ключевые слова:* хроническая болезнь почек, анемия, стимуляторы эритропоэза, циркулирующая форма  $\alpha$ -Klotho.

## Impact of anemia correction on the production of the circulating morphogenetic protein $\alpha$ -Klotho in patients with Stages 3B—4 chronic kidney disease: A new direction of cardionephroprotection

YU.S. MILOVANOV, N.A. MUKHIN, L.V. KOZLOVSKAYA, S.YU. MILOVANOVA, M.M. MARKINA

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Aim.** To investigate the impact of anemia correction with erythropoiesis stimulants on the serum level of the circulating morphogenetic protein  $\alpha$ -Klotho in patients with Stages 3B—4 chronic kidney disease (CKD).

**Subjects and methods.** 64 patients aged  $42 \pm 8$  years with Stages 3B—4 nondiabetic CKD were examined and divided into 2 groups: 1) 32 patients with anemia (the target hemoglobin levels could be achieved and kept with erythropoietin and iron saccharate in 20 patients (Group A) and those could not be done in 12 patients (Group B)). A control group (Group 2) consisted of 32 non-anemic patients matched for gender, age, and degree of a glomerular filtration rate (GFR) reduction. Along with iron exchange indicators, the time course of changes in serum Klotho levels were examined in all the 64 patients during screening and one year after the end of the study. For correction of anemia, 32 patients with this condition (Groups 1A and 1B) took short-acting epoetin (hypodermic recormon 2,000 IU thrice per week + iron (intravenous venofer 5 ml of 100 mg once per week)) under control of hemoglobin levels and serum transferrin iron and ferritin saturation. After achieving the target hemoglobin level of 110–120 g/l, for its keeping, all the patients received, instead of short-acting epoetin, long-acting hypodermic darbepoetin- $\alpha$  1.5  $\mu$ g once every 2 months and intravenous iron saccharate 100 mg once every 2 weeks.

**Results.** Among the 32 anemic patients in Group 1, 20 (63%) (Group 1 A) could achieve the target hemoglobin level (110—120 g/l) and maintain it within this range, by performing therapy with epoetin- $\beta$  + iron saccharate; anemia (the hemoglobin level of  $< 110$  g/l) persisted in 12 (37%) patients (Group 1B) despite the fact that epoetin and iron saccharate had been administered. Group

1A was noted to have an increase in  $\alpha$ -Klotho concentrations by an average of  $100 \pm 11.6$ -pg/ml as compared to Group 1B (by only  $72 \pm 4.2$  pg/ml). At the same time, the  $\alpha$ -Klotho levels in the control group by the end of the follow-up decreased by an average of  $210 \pm 12.9$  pg/ml as compared to the prescreening value. There was a direct correlation between hemoglobin and serum ferritin concentrations and iron ferritin saturation percentage and  $\alpha$ -Klotho levels. It was ascertained that the hemoglobin concentration of  $\geq 110$  g/l with a sensitivity of 89% and a specificity of 75% could predict higher serum  $\alpha$ -Klotho levels in CKD. The same patients were found to have an inverse relationship between the serum level of  $\alpha$ -Klotho and the risk of cardiovascular events.

**Conclusion.** The serum level of the protein Klotho is not only a marker for the severity of CKD and its complications (anemia, left ventricular hypertrophy, and heart failure), but also a pathogenetic factor of CKD progression. Anemia correction with erythropoiesis stimulants has been shown to enhance the renal and extrarenal production of  $\alpha$ -Klotho.

*Keywords:* chronic kidney disease, anemia, erythropoiesis stimulants, circulating  $\alpha$ -Klotho.

СКФ — клубочковая фильтрация  
ССО — сердечно-сосудистые осложнения

ХБП — хроническая болезнь почек  
TRPVs — рецептор кальциевых каналов

В последние годы пристальное внимание исследователей привлечено к многофункциональной роли в организме морфогенетического белка Klotho\*. На основе накопленных научных данных стало очевидным, что циркулирующая форма Klotho существенным образом влияет на продолжительность жизни и связанные с этим физиологические процессы [1–3].

В экспериментальных исследованиях дефект экспрессии гена Klotho сокращал продолжительность жизни животных в результате замедления роста, атрофии кожи и мышц, кальцификации сосудов, остеопении, эмфиземы легких, а также когнитивных дисфункций и дегенерации моторных нейронов [2]. У животных с таким фенотипом выявляли повышение в сыворотке крови уровня  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , фосфора и кальция, кальцификацию сердца и сосудов [3]. Напротив, при инфузии экзогенного белка Klotho пациентам с острым повреждением почек отмечалось значительное улучшение гистологической картины при повреждении как канальцев, так и клубочков почки [3]. Установлено, что с возрастом и при развитии хронической болезни почек (ХБП) продукция Klotho значительно уменьшается [4].

Белок Klotho существует в двух формах — трансмембранной и экстрацеллюлярной (секретируемой) —  $\alpha$ -Klotho [2]. Обе формы белка Klotho продуцируются клетками проксимальных почечных канальцев, трансмембранная форма синтезируется также клетками околоститовидных желез [1]. Трансмембранный белок Klotho формирует комплекс с рецептором FGF-23 (FGFR) и функционирует как облигантный корцептор FGF-23, обуславливая фосфатурию [1, 3]. В отличие от трансмембранной формы растворимая форма белка Klotho ( $\alpha$ -Klotho) проявляет преимущественно гормональные качества, действуя как эндо- и паракринный фактор. В спектр паракринных функций

$\alpha$ -Klotho входит активация потенциала рецепторов кальциевых каналов (TRPVs), особенно TRVP5 и TRVP6 [3]. TRVP5 располагаются преимущественно в дистальных почечных канальцах и принимают участие в реабсорбции кальция в почках, обеспечивая баланс кальция в организме. К гормональным функциям  $\alpha$ -Klotho относят его антивозрастной и кардиопротекторные эффекты. Установлено, что  $\alpha$ -Klotho снижает окислительный стресс посредством блокирования инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1-го типа, а также стимулирования продукции оксида азота, что приводит к улучшению зависимой от эндотелия вазодилатации [4].

Разработка стратегий повышения продукции  $\alpha$ -Klotho в организме может затормозить темпы прогрессирования ХБП и формирования обусловленных почечной недостаточностью костно-минеральных и сердечно-сосудистых осложнений (ССО).

Мы изучили влияние коррекции анемии препаратами, стимулирующими эритропоэз, на уровень в сыворотке крови циркулирующей формы морфогенетического белка Klotho ( $\alpha$ -Klotho) у больных ХБП с 3Б–4 стадиями.

## Материалы и методы

Обследовали 64 больных с ХБП 3Б–4 стадии в возрасте от 20 до 65 лет ( $42 \pm 8$  лет), большинство составили лица среднего возраста с некоторым преобладанием мужчин. В зависимости от наличия или отсутствия анемии всех больных, вошедших в исследование, распределили в 2 группы. Первую группу составили 32 больных с анемией, среди которых у 20 с помощью эритропоэтина и железа сахара удалось достичь и поддерживать целевой уровень гемоглобина (группа 1А), и 12 больных, которым терапия не позволила достигнуть целевого уровня гемоглобина (группа 1Б). Во 2-ю группу (контроля) вошли 32 больных без анемии, сопоставимых с больными 1-й группы по полу, возрасту и степени снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ).

У большинства больных (38%) причиной ХБП служил хронический гломерулонефрит латентного течения, а также хронический тубулоинтерстициальный нефрит (31%) и гипертензивный нефросклероз (31%). Из исследования исключены пациенты с нефротическим синдромом, активными формами гломерулонефрита, системными васкулитами.

У всех 64 больных с ХБП 3Б–4 стадии во время скрининга и через 1 год после окончания исследования наряду с общеклиническими показателями, а также показателями обмена железа

\*Белок Klotho назван в честь богини Клото (Klotho), согласно древнегреческой мифологии пряжущей нить человеческой жизни.

### Сведения об авторах:

Мухин Николай Алексеевич — проф., зав. каф. терапии, внутренних болезней и пульмонологии, акад. РАН

Козловская Лидия Владимировна — проф. каф. внутренних, профессиональных болезней и пульмонологии

Милованова Светлана Юрьевна — д.м.н., в.н.с. научно-образовательного клинического центра Здоровьесберегающих технологий

Маркина Марина Михайловна — асп. каф. нефрологии и гемодиализа Института профессионального образования

### Контактная информация:

Милованов Юрий Сергеевич — д.м.н., в.н.с. отд. нефрологии научно-исследовательского центра Института профессионального образования; e-mail. yurijmilovanov@mail.ru

(ферритин сыворотки, насыщение трансферрина железом) изучена динамика уровня в сыворотке крови Klotho (Human alpha — KI ELISA с использованием анти-Klotho-антител). Исследование циркулирующей формы Klotho ( $\alpha$ -Klotho) проводили по стандартному протоколу специалисты диагностической лаборатории «Вера».

Для коррекции анемии 32 пациента с анемией (группы 1А и 1Б) получали эпоэтин короткого действия (рекормон по 2000 ЕД 3 раза в неделю подкожно) + железо (венофер 5 мл 100 мг 1 раз в неделю внутривенно) под контролем уровня гемоглобина, насыщения трансферрина железом и ферритина сыворотки. После достижения целевого уровня гемоглобина 110 — 120 г/л в дальнейшем для поддержания его целевого значения всем пациентам вместо эпоэтина короткого действия вводили эпоэтин длительного действия — дабепоэтин- $\alpha$  1,5 мкг на 1 кг 1 раз в 2 мес подкожно и железа сахарат 100 мг 1 раз в 2 нед внутривенно.

Статистическую обработку данных исследования выполняли при помощи программ SPSS 10 for Windows. При статистическом анализе для протяженных переменных в зависимости от соответствия данных нормальному распределению рассчитывали среднее арифметическое ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\sigma$ ). Для выявления и оценки связей между исследуемыми показателями применяли непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Для оценки чувствительности и специфичности изменений уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови в зависимости от уровня гемоглобина проведен ROC-анализ.

## Результаты

Среди 32 больных 1-й группы с анемией у 20 (63%) (группа 1А) терапия эпоэтином- $\beta$  + железа сахаратом позволила достигнуть целевого уровня гемоглобина (110—120 г/л) и поддерживать его в этом диапазоне; у 12 (37%) больных (группа 1Б), несмотря на введение эпоэтина и железа сахарата, сохранялась анемия (уровень гемоглобина  $< 110$  г/л).

Мы сравнили концентрацию  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови больных (группа 1А) с достигнутым целевым уровнем гемоглобина и больных, которым не удалось достичь целевого уровня гемоглобина (группа 1Б), а также с концентрацией  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови больных без анемии (2-я группа) в начале исследования и через 12 мес после его окончания (рис. 1).

У больных, которым удалось достичь и поддерживать целевой уровень гемоглобина (группа 1А) отмечено увеличение концентрации  $\alpha$ -Klotho в среднем на  $100 \pm 11,6$  пг/мл по сравнению с таковой у больных, которые в период лечения анемии не достигли целевой уровень гемоглобина (группа 1Б), увеличение концентрации  $\alpha$ -Klotho составило только  $72 \pm 4,2$  пг/мл. В то же время в контрольной группе больных к концу наблюдения уровень  $\alpha$ -Klotho уменьшился в среднем на  $210 \pm 12,9$  пг/мл по сравнению показателем скрининга (см. рис. 1).

По данным корреляционного анализа, у больных ХБП ЗБ—4 стадии отмечена прямая связь между концентрацией гемоглобина и уровнем  $\alpha$ -Klotho (рис. 2).

При анализе показателей обмена железа отмечена корреляция концентрации ферритина в сыворотке крови и процентом насыщения железом трансферрина и уровнем  $\alpha$ -Klotho у больных ХБП ЗБ—4 стадии с анемией (см. таблицу).

Для определения уровня гемоглобина, при котором возможно прогнозировать повышение уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови больных с ЗБ—4 стадиями ХБП и анемией, мы провели ROC-анализ (рис. 3).

## Связь показателей обмена железа с концентрацией $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови у больных ХБП ЗБ—4 стадии

Показатель	$\alpha$ -Klotho, пг/мл	
	$r$	$p$
Ферритин, мкг/л	0,429	0,05
Насыщение трансферрина железом, %	0,480	0,05

Площадь под кривой (AUC) гемоглобина  $\geq 110$  г/л составила 0,74 (при 95% доверительном интервале от 0,646 до 0,852;  $p < 0,001$ ), т.е. уровень гемоглобина  $\geq 110$  г/л с чувствительностью 89% и специфичностью 75% позволяет прогнозировать выявление более высокого уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови при ХБП.

У тех же больных выявлена обратная связь между уровнем  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови и риском развития ССО (рис. 4).

## Обсуждение

По данным проведенного нами исследования, у 50% больных ХБП ЗБ—4 стадии диагностирована анемия. Выявлены ассоциации уровня ферритина в сыворотке, насыщением железом трансферрина и концентрации гемоглобина с уровнем циркулирующей формы белка Klotho. Отмечено, что связь  $\alpha$ -Klotho с достижением целевого уровня гемоглобина (110—120 г/л) значительно сильнее ( $p < 0,01$ ), чем с уровнем ферритина в сыворотке ( $p < 0,05$ ) и насыщением железом трансферрина ( $p < 0,05$ ). Уровень  $\alpha$ -Klotho прямо коррелировал с целевым уровнем гемоглобина ( $r = 0,736$ ;  $p < 0,001$ ) и обратно с СКФ ( $r = -0,420$ ;  $p < 0,05$ ). Установлена обратная связь уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке с риском развития у наблюдаемых нами больных ХБП ССО.

Возможны различные механизмы уменьшения продукции  $\alpha$ -Klotho при снижении СКФ. Уменьшенную продукцию  $\alpha$ -Klotho большинство авторов связывают с нарушением структурной целостности почечной паренхимы [1—3]. В нашем исследовании коррекция анемии позволяла увеличивать уровень  $\alpha$ -Klotho в сыворотке при достижении целевой концентрации гемоглобина. Возможно, это связано с влиянием таких факторов, как уменьшение гипоксии тубулоинтерстициальной ткани почек при коррекции анемии. Эти данные позволяют предположить, что уровень гемоглобина у больных ХБП обладает прогностической информацией в отношении сохранности или усиления способности почек к продукции Klotho как возможного гомеостатического фактора в условиях нарастания дисфункции почек.

Установлено, что Klotho синтезируется не только в почках, но и в сосудистых сплетениях головного мозга и в менее значительных количествах в гипофизе, околотитовидных железах, плаценте, скелетных мышцах, кишечнике и миокардиоцитах [1, 2]. Мы допускаем, что выявленное нами повышение уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови у больных ХБП может происходить хотя бы частично за счет внепочечного усиления продукции белка Klotho, возможно, и в миокардиоцитах в условиях устранения гипоксии. В этом плане заслуживают внимания результаты исследования К. Takeshita и соавт. [5], в котором обнаруже-

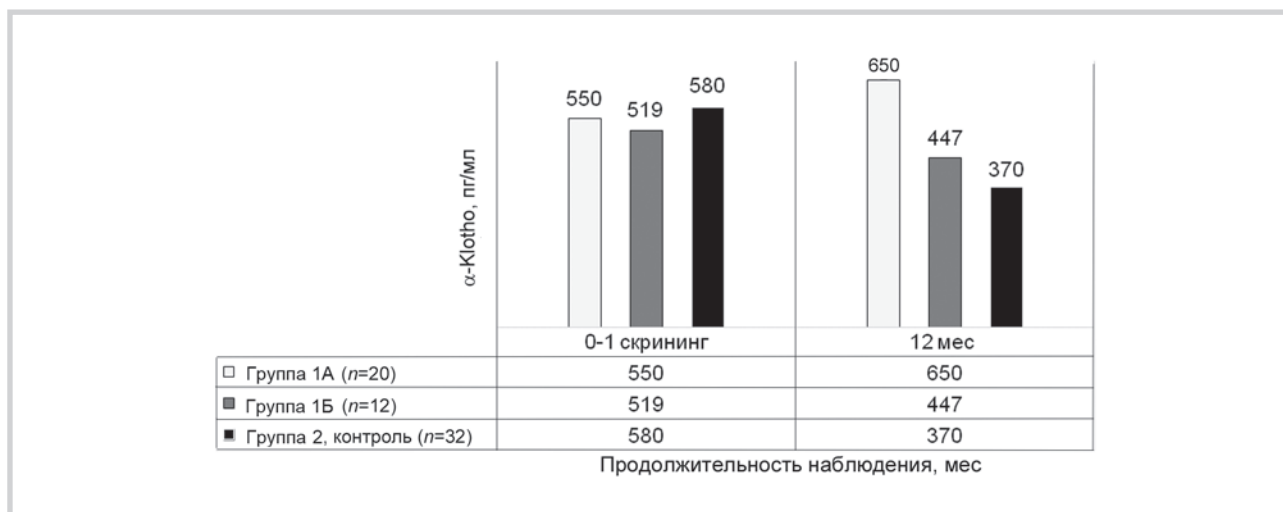


Рис. 1. Динамика уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови больных ХБП 3Б—4-й стадии с анемией (группы 1А и 1Б), которым проводилось лечение анемии, и без анемии (2-я группа).

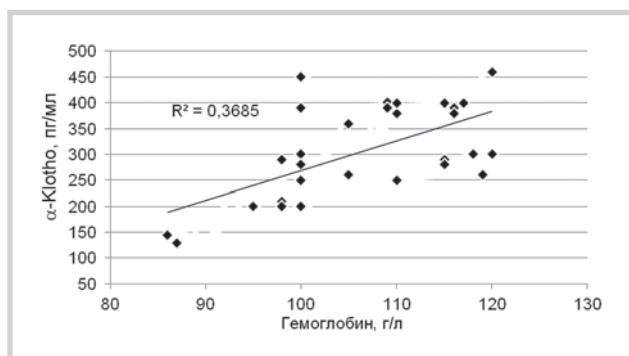


Рис. 2. Корреляция между концентрацией гемоглобина и уровнем  $\alpha$ -Klotho у больных ХБП 3Б—4-й стадии с анемией ( $p < 0,01$ ).

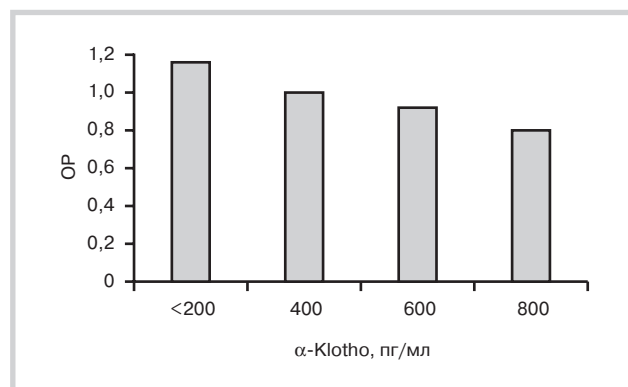


Рис. 4. Риск развития ССО в зависимости от уровня  $\alpha$ -Klotho в сыворотке крови больных ХБП 3Б—4-й стадии. ОР — относительный риск.

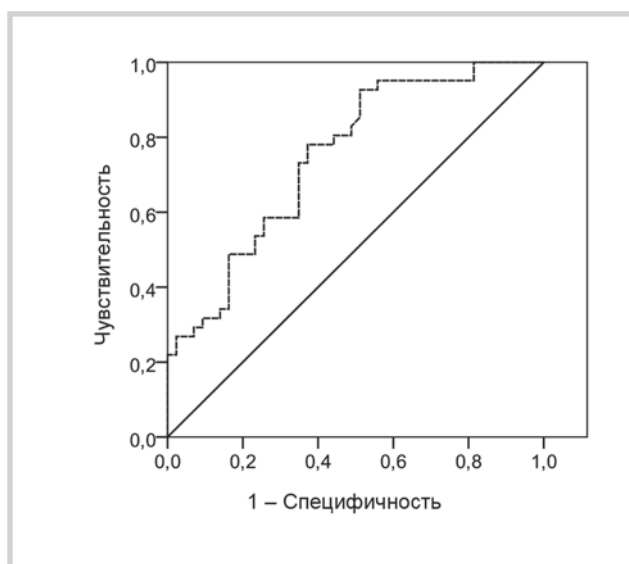


Рис. 3. ROC-кривая взаимосвязи концентрации гемоглобина и уровня  $\alpha$ -Klotho у пациентов с ХБП 3Б—4-й стадии.

на экспрессия гена Klotho в синоатриальном узле сердца и выявлена высокая частота внезапной сердечной смерти мышей с блокированным геном Klotho вследствие дисфункции синоатриального узла.

Что касается эффекта экзогенного эритропоэтина у больных ХБП, то кроме поддержания синтеза белка Klotho, можно обсуждать и его плеiotропные эффекты, в частности на активацию стволовых эндотелиальных клеток и миокардиального неоангиогенеза, торможение апоптоза миокардиоцитов и, возможно, других клеток [2, 4]. Это согласуется с полученными нами данными о положительном влиянии экзогенного эритропоэтина на снижение риска развития ССО у больных ХБП, коррелирующее с повышением уровня циркулирующей формы белка Klotho.

### Заключение

Таким образом, уровень белка Klotho в сыворотке крови является не только маркером тяжести ХБП и ее ос-

ложнений (анемия, гипертрофия левого желудочка сердца, сердечная недостаточность), но и, по-видимому, патогенетическим фактором прогрессирования ХБП.

Необходимо продолжение изучения изменений продукции циркулирующей формы Klotho при ХБП для определения путей стимуляции ее продукции. В проведенном нами исследовании показана возможность усиления продукции белка Klotho в почках с учетом установ-

ленной обратимости нарушенной его продукции и внепочечно через коррекцию анемии средствами, стимулирующими эритропоэз.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда грант №14-15-00947 2014 г.*

Конфликт интересов отсутствует.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kuro-o M. Klotho in chronic kidney disease-What is new? *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(6):1705-1708.  
doi:10.1093/ndt/gfp069.
2. Wang Y, Kuro-o M, Sun Zhongjie. Klotho Gene Delivery Suppresses Nox2 Expression and Attenuates Oxidative Stress in Rat Aortic Smooth Muscle Cells via the cAMP-PKA Pathway. *Aging Cell*. 2012;11(3):410-417.  
doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00796.x.
3. Sowers KM, Hayden MR. Calcific uremic arteriopathy. Pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(2):109-121.  
doi:10.4161/oxim.3.2.5.
4. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.  
doi:10.1038/36285.
5. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with defect of Klotho gene expression. *J Circulation*. 2004;109:1776-1782.  
doi:10.1161/01.CIR.0000124224.48962.32.

Поступила 25.02.2016