

УДК 616.71-008.9:616.61-036.1]-092.9-07:612.1

## РОЛЬ ОСТЕОПРОТЕГЕРИНА, RANKL И ИНТЕРЛЕЙКИНА-17 В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЯ КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА

**Павлов С.Б., Бабенко Н.М., Кумечко М.В.**

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

*e-mail: marina\_sash@mail.ru*

Нарушения костного метаболизма, вызванные хронической болезнью почек (ХБП), характеризуются дисбалансом в механизмах ремоделирования костной ткани. Использование глюкокортикоидов для лечения заболеваний почек усугубляет эти нарушения. В работе были исследованы взаимосвязи остеопротегерина, RANKL и интерлейкина-17 в механизмах нарушения ремоделирования костной ткани при экспериментальной хронической болезни почек с последующим воздействием глюкокортикоидов. Было обнаружено увеличение уровней RANKL и провоспалительного ИЛ-17, а также уменьшение содержания OPG в сыворотке крови животных экспериментальной группы. Отмечен совокупный эффект действия провоспалительных цитокинов и глюкокортикоидов. Обнаруженные корреляционные связи свидетельствуют в пользу важной роли исследуемых цитокинов в нарушениях костного ремоделирования при хронической болезни почек с воздействием глюкокортикоидов.

**Ключевые слова:** цитокины, ремоделирование костной ткани, хроническая болезнь почек, глюкокортикоиды.

### Введение

Нарушения костного метаболизма, вызванные хронической болезнью почек (ХБП) и приводящие к развитию вторичного остеопороза, характеризуются дисбалансом в механизмах ремоделирования костной ткани [1]. Ремоделирование представляет собой сопряженные во времени процессы резорбции и формирования кости, достигающиеся за счет межклеточного взаимодействия, опосредованного влиянием множества цитокинов и факторов роста. Для лечения ХБП (при быстро прогрессирующем гломерулонефрите, в тяжелых случаях острого интерстициального нефрита) используют глюкокортикоиды, одним из механизмов действия которых является подавление продукции медиаторов воспаления. Глюкокортикоиды также обладают противовоспалительным, десенсибилизирующим, противоаллергическим и иммунодепрессивным действием, а также противошоковыми и антитоксическими свойствами [2].

Однако, использование для лечения заболеваний почек глюкокортикоидов усугубляет нарушения метаболизма костной ткани, приводя к остеопорозу [3,4]. До сих пор остается неизученным вопрос, на какой стадии хронической болезни почек начинается развиваться дефицит массы костной ткани.

Пониманию механизмов развития стероидного остеопороза способствовало открытие системы регуляторных белков остеопротегерин (OPG)— активатора рецептора NF-κB-лиганд (RANKL) — RANK, которые рассматриваются в качестве основных сигнальных путей, контролирующих резорбцию кости в физиологических и патологических условиях [5].

Важную роль в регуляции метаболизма костной ткани играет провоспалительный цитокин интерлейкин-17 (ИЛ-17), продуцируемый активированными Т-клетками. ИЛ-17 способен усиливать дифференциацию остеокластов и их функциональную активность через

RANKL (прямым и непрямым путем) и другие остеокластогенные факторы, что приводит к формированию костно-деструктивных изменений [6].

**Цель работы:** изучение роли межклеточных медиаторов (на примере остеопротегерина, RANKL и интерлейкина-17) в механизмах нарушения ремоделирования костной ткани в эксперименте на модели нарушения ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек с последующим воздействием глюкокортикоидов.

#### Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводилось в 2 группах (по 50 животных) белых крыс самок в возрасте 9 мес. массой  $210 \pm 30$  г. Первая группа – контрольная (К), была сформирована из интактных животных. Животным второй экспериментальной группы (ХБП+ГК) моделирование нарушения костного метаболизма при ХБП с последующим воздействием глюкокортикоидов проводилось по методике Кондакова И.И. с соавт. [7]. ХБП, развившаяся с течением времени после воздействия, которое вызвало острую почечную недостаточность, осуществляли путем однократного введения 50 % раствора глицерина в дозе 10 мл/кг массы тела животного. Развитие ХБП контролировали в соответствии с методикой авторов модели [7]. Через 6 недель после этого животным в течение месяца проводились инъекции 1,5 мг/кг дексаметазона фосфата внутримышечно дважды в неделю.

Нарушение ремоделирования костной ткани контролировали с помощью прямого измерения плотности кости, которую рассчитывали как отношение массы кости (г) к объему данной кости ( $\text{см}^3$ ) [8]. Объем кости определяли по объему вытесненной жидкости.

Кровь для исследования животных брали из сердца.

Исследование цитокинового профиля проводилось в сыворотке крови

методом иммуноферментного анализа. Уровень интерлейкина-17 и определяли с помощью набора реагентов Вектор-Бест (Россия). Исследование уровня ampli-sRANKL проводили с помощью набора BIOMEDICA (Австрия). Определение уровня остеопротегерина осуществляли, используя набор eBioscience (Австрия).

Математическая обработка результатов была проведена с применением пакета статистического анализа Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными, если значение вероятности было больше или равно 95 % ( $p < 0,05$ ).

#### Результаты и обсуждение

При исследовании плотности кости было отмечено ее снижение в группе животных ХБП+ГК ( $1,431 \pm 0,038$  г/ $\text{см}^3$ ) по сравнению с контрольной группой ( $1,53 \pm 0,026$  г/ $\text{см}^3$ ), что подтверждает нарушение ремоделирования кости в этой группе. Однако эта разница была статистически не значима.

Как видно из табл. 1, у животных экспериментальной группы уровни содержания в крови цитокинов ИЛ-17 и RANKL были достоверно выше, чем у интактных животных ( $p < 0,05$ ). В то же время в группе животных с ХБП+ГК сывороточный уровень OPG был достоверно ниже аналогичного уровней у животных из контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

В группе животных ХБП+ГК на 32 % увеличивается уровень провоспалительного цитокина ИЛ-17. По данным литературы ИЛ-17 увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов при ХБП [9], которые, в свою очередь, повышают производство рецептора активатора ядерного фактора-кв лиганда (RANKL) и стимулируют дифференциацию и активацию остеокластов, что приводит к потере костной массы. ИЛ-17 также уменьшает экспрессию OPG в клетках остеобластов, что способствует

Таблица 1 тикоидов.

Уровни цитокинов в контрольной и экспериментальной группах

Цитокины	Группа	
	Контроль	Группа с моделью нарушения ремоделирования костной ткани при ХБП+ГК
ИЛ-17, пг/мл	28,166 ± 0,526	37,143 ± 1,014*
RANKL, пмоль/л	0,131 ± 0,006	0,184 ± 0,018*
OPG, пг/мл	21,588 ± 0,763	16,588 ± 0,669*

Примечание: \* — (p < 0,05) в сравнении с контрольной группой

Таблица 2

Корреляции в контрольной и экспериментальной группах

Группы	Контрольная группа		Группа с моделью нарушения ремоделирования костной ткани при ХБП+ГК	
	ИЛ-17	RANKL	ИЛ-17	RANKL
Цитокины				
RANKL	-0,003	-	0,54*	-
OPG	0,03	-0,09	0,64*	0,11

Примечание: \* — (p < 0,05) в сравнении с контрольной группой

ет остеокластогенезу и снижению плотности костной ткани [10]. В дополнение к эффектам от ХБП, эффекты от применения лекарственных препаратов играют важную роль в снижении минеральной плотности кости при ХБП. Так, в группе ХБП+ГК сывороточный уровень RANKL увеличивается на 40 % и на 77 % уменьшается уровень его природного антагониста OPG. Это подтверждает данные исследователей о том, что глюкокортикоиды увеличивают экспрессию RANKL остеобластами и ингибируют синтез OPG, приводя к дифференциации остеокластов, в результате чего происходит стимуляция костной резорбции [11]. Глюкокортикоиды действуют непосредственно на остеокласты, уменьшая апоптоз зрелых остеокластов. При этом они продлевают продолжительность жизни остеокластов, несмотря на сокращение числа их предшественников [12]. С другой стороны, глюкокортикоиды подавляют пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность остеобластов и индуцируют их апоптоз [13]. Таким образом, наблюдаемая нами в экспериментальной группе потеря минеральной плотности костной ткани происходит, по всей видимости, в результате дисбаланса числа остеобластов и остеокластов под воздействием глюкокор-

тикоидов. При проведении корреляционного анализа было обнаружено, что RANKL и OPG слабо коррелируют друг с другом в контрольной и в экспериментальной группах, что может свидетельствовать о том, что в регуляции синтеза этих цитокинов задействовано множество различных процессов, влияние которых не всегда отражают их сывороточные уровни.

В то же время в группе ХБП+ГК RANKL и OPG достоверно коррелируют с провоспалительным ИЛ-17. Это свидетельствует о том, что в экспериментальной группе ИЛ-17 индуцирует экспрессию RANKL и ингибирует продукцию остеопротегерина – ключевых регуляторов остеокластогенеза, что приводит к потере костной массы в этой группе животных. Т.е. противовоспалительный цитокин является прямым стимулятором RANKL в рамках одного из возможных патогенетических механизмов.

**Выводы**

В группе животных с моделью нарушения ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек с последующим воздействием глюкокортикоидов увеличиваются уровни RANKL и провоспалительного ИЛ-17, а содержание OPG уменьшается. Вероятно, сказывается совокупный эффект действия провоспалительных цитокинов, схожий с эффектом глюкокортикоидов, и действия самих глюкокортикоидов.

Обнаруженные корреляционные связи между уровнем интерлейкина-17,

RANKL и остеопротегерина свидетельствуют в пользу важной роли исследуемых цитокинов в нарушениях костного ремоделирования при хронической болезни почек с воздействием глюкокортикоидов.

### Литература

1. Miller P.D. Diagnosis and treatment of osteoporosis in chronic renal disease / P.D. Miller // *Semin Nephrol.* — 2009. — Vol. 29(2). — P. 144—55.
2. Coutinho A.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights / A.E. Coutinho, K.E. Chapman // *Mol Cell Endocrinol.* — 2011. — Vol. 335(1). — P. 2—13
3. Compston J. Therapy Management of glucocorticoid-induced osteoporosis / J. Compston // *Nat Rev Rheumatology.* — 2010. — Vol. 6(2). — P. 82—88.
4. Kuchuk N.O. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an overview / N.O. Kuchuk, J.N. Hoes, J.W.J. Bijlsma, J.W.G. Jacobs // *Int J Clin Rheumatol.* — 2014. — Vol. 9(3). — P. 311—326.
5. Walsh M.C. Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond / M.C. Walsh, Y. Choi // *Front. Immunol.* — 2014. — Vol. 5: 511.
6. Lee.Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases / Y. Lee // *BMB Rep.* — 2013. — Vol. 46(10). — P. 479—483.
7. Кондаков І.І. Вплив гліцеролу на функціонально-морфологічні показники нирок при моделюванні гострої та хронічної ниркової недостатності у щурів / І.І. Кондаков, І.І. Топчій, О.М. Кірієнко // *Український журнал нефрології та діалізу.* — 2013. — № 3(39). — С. 14-20.
8. Подковкин В.Г. Влияние постоянного магнитного поля на состояние костной ткани крыс с повышенным уровнем резорбции / В.Г. Подковкин, Д.Г. Иванов, Г.А. Иванов // *Успехи современного естествознания.* — 2008. — № 7. — С. 13-16.
9. Ramani K. An essential role of interleukin-17 receptor signaling in the development of autoimmune glomerulonephritis / K. Ramani, S. Pawaria, K. Maers, A.R. Huppler, S.L. Gaffen, P.S. Biswas // *J Leukoc Biol.* — 2014. — Vol. 96(3). — P. 463—72.
10. Cheung W.W. The impact of inflammation on bone mass in children / W.W. Cheung, J.Y. Zhan, K.H. Paik, R.H. Mak // *Pediatr Nephrol.* — 2011. — Vol 26(11). — P. 1937—1943.
11. Hakeda Y. Action of glucocorticoid on bone-forming and bone-resorbing cells / Y. Hakeda // *Clin Calcium.* — 2006. — Vol. 16(11). — P. 1817—22.
12. Jia D. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density / D. Jia, C.A. O'Brien, S.A. Stewart, S.C. Manolagas, R.S. Weinstein // *Endocrinology.* — 2006. — Vol. 147. — P. 5592—9.
13. Eijken M. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization / M. Eijken, M. Koedam, M. van Driel, C.J. Buurman, H.A. Pols, J.P. van Leeuwen // *Molecular and Cellular Endocrinology.* — 2006. — Vol. 248. — P. 87—93.

### References

1. Miller P.D. 2009, «Diagnosis and treatment of osteoporosis in chronic renal disease», *Semin Nephrol*, Vol. 29, No 2, pp. 144-155.
2. Coutinho A.E., Chapman K.E. 2011, «The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights», *Mol Cell Endocrinol*, Vol. 335, No 1, pp. 2-13.
3. Compston J. 2010, «Therapy Management of glucocorticoid-induced osteoporosis», *Nat Rev Rheumatology*, Vol. 6, No 2, pp. 82-88.
4. Kuchuk N.O., Hoes J.N., Bijlsma J.W.J., Jacobs J.W.G. 2014, «Glucocorticoid-induced osteoporosis: an overview», *Int J Clin Rheumatol*, Vol. 9, No 3, pp. 311-326.
5. Walsh M.C., Choi Y. 2014, «Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond», *Front Immunol*, Vol. 5, Article 511.
6. Lee.Y. 2013, «The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases», *BMB Rep*, Vol. 46, No 10, pp. 479-483.
7. Kondakov I.I., Topchii I.I., Kirienko O.M. 2013, «Influence of glycerol on functional-morphological indicators of kidneys at modelling renal insufficiency in rats», *Ukr J Nephrol Dialysis*, Vol. 3, No 39, pp. 14-

20 [in Ukrainian].

8. Podkovkin V.G., Ivanov D.G., Ivanov G.A. 2008, «The effect of magnetic field on the bone tissue status in rats with high level bone resorption», *Adv Curr Nat Sci*, Vol.7, pp. 13-16 [in Russian].
9. Ramani K., Pawaria S., Maers K., Huppler A.R., Gaffen S.L., Biswas P.S. 2014, «An essential role of interleukin-17 receptor signaling in the development of autoimmune glomerulonephritis», *J Leukoc Biol*, Vol. 96, No 3, pp. 463-472.
10. Cheung W.W., Zhan J.Y., Paik K.H., Mak R.H. 2011, «The impact of inflammation on bone mass in children» *Pediatr Nephrol*, Vol 26, No 11, pp. 1937-1943.
11. Hakeda Y. 2006, «Action of glucocorticoid on bone-forming and bone-resorbing cells», *Clin Calcium*, Vol. 16, No 11, pp. 1817-1822.
12. Jia D., O'Brien C.A., Stewart S.A., Manolagas S.C., Weinstein R.S. 2006, «Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density», *Endocrinology*, Vol. 147, pp. 5592-5599.
13. Eijken M., Koedam M., van Driel M., Buurman C.J., Pols H.A., van Leeuwen J.P. 2006, «The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization», *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 248, pp. 87-93.

### Резюме

#### РОЛЬ ОСТЕОПРОТЕГЕРИНУ, RANKL ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-17 В МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ.

*Павлов С.Б., Бабенко Н.М., Кумечко М.В.*

Порушення кісткового метаболізму, викликані хронічною хворобою нирок (ХХН), характеризуються дисбалансом у механізмах ремоделювання кісткової тканини. Використання глюкокортикоїдів для лікування захворювань нирок посилює ці порушення. У роботі були досліджені взаємозв'язки остеопротегерину, RANKL та інтерлейкіну-17 у механізмах порушення ремоделювання кісткової тканини при експериментальній хронічній хворобі нирок з наступним впливом глюкокортикоїдів. Було вияв-

лено збільшення рівнів RANKL і прозапального ІЛ-17, а також зменшення вмісту OPG в сироватці крові тварин експериментальної групи. Був відзначений сукупний ефект дії прозапальних цитокінів та глюкокортикоїдів. Виявлені кореляційні зв'язки свідчать на користь важливої ролі досліджуваних цитокінів в порушеннях кісткового ремоделювання при хронічній хворобі нирок з впливом глюкокортикоїдів.

**Ключові слова:** цитокіни, ремоделювання кісткової тканини, хронічна хвороба нирок, глюкокортикоїди.

### Summary

#### THE ROLE OF OSTEOPROTEGERIN, RANKL AND INTERLEUKIN-17 IN THE MECHANISMS OF DISORDERS OF BONE METABOLISM

*Pavlov S.B., Babenko N.M., Kumechko M.V.*

Disorders of bone metabolism caused by chronic kidney disease (CKD), are characterized by an imbalance in the mechanisms of bone remodeling. The use of glucocorticoids for the treatment of kidney disease exacerbates these violations. In this paper we have investigated the relationship of osteoprotegerin, RANKL and IL-17 in the mechanisms of violations of bone remodeling in experimental chronic kidney disease followed by glucocorticoids exposure. It has been found to increase levels of RANKL and proinflammatory IL-17, as well as reduction of OPG in serum of animals in the experimental group. Was marked by the cumulative effect of proinflammatory cytokines and glucocorticoids. Discovered correlations testify in favor of the important role of these cytokines in disorders of bone remodeling in chronic kidney disease with exposure to glucocorticoids.

**Keywords:** cytokines, bone tissue remodeling, chronic kidney disease, glucocorticoids.

*Впервые поступила в редакцию 17.04.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*