

Порушення регуляторних механізмів ремоделювання кісткової тканини в умовах експериментальної хронічної хвороби нирок

С.Б. Павлов, М.В. Кумечко, О.Б. Літвінова, Н.М. Бабенко, А.В. Гончарова

Харківська медична академія післядипломної освіти; e-mail: marina_sash@mail.ru

Метою нашої роботи було вивчення ролі міжклітинних медіаторів – рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 (ІЛ-1 РА), інтерлейкіну-17 (ІЛ-17), ліганду активатора рецептора ядерного фактора кВ (RANKL) та остеопротегерину в механізмах регуляції метаболізму ниркової та кісткової тканин на моделі порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок (ХХН). Було виявлено вірогідне збільшення вмісту цитокінів ІЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл), ІЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл), остеопротегерину ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) і RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) у сироватці крові тварин з порушенням кісткового ремоделювання при ХХН порівняно зі вмістом досліджуваних цитокінів у тварин контрольної групи ($2,529 \pm 0,132$ пг/мл, $28,166 \pm 0,526$ пг/мл, $21,588 \pm 0,763$ пг/мл і $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л відповідно; $P < 0,05$). Кореляції, виявлені під час дослідження, відображають взаємозв'язки в системі регуляції ремоделювання кісткової тканини і розвитку запалення при хворобі нирок. Порушення балансу між про- та протизапальними цитокінами має велике значення як у розвитку ХХН, так і в процесах ремоделювання кісткової тканини.

Ключові слова: ремоделювання кісткової тканини; хронічна хвороба нирок; про- та протизапальні цитокіни.

ВСТУП

Хронічне захворювання нирок (ХХН), незалежно від етіології, характеризується тривалим прогресуючим перебігом з поступовим зниженням і втратою ниркових функцій. Ступінь зниження функції нирок при цій хворобі пов'язана з мірою пошкодження тубулоінтерстицію, фіброзування якого визначає прогресію ниркової дисфункції [1]. Ключову роль у формуванні тубулоінтерстиціальних змін відіграють тубулярні клітини, пошкодження яких супроводжується синтезом цитокінів і факторів росту, що беруть участь у формуванні клітинного інфільтрату в інтерстиції [2]. Ці міжклітинні медіатори можуть бути маркерами проліферативних змін у тубулоінтерстиціальній тканині.

Водночас патологія нирок є одним з чинників порушення ремоделювання кісткової тканини, які виникають внаслідок зміни

балансу між активністю остеокластів, що резорбують кісткову тканину, і остеобластів, що забезпечують утворення кістки [3]. Ці процеси, так само як і етапи тубулоінтерстиціального ушкодження, опосередковані впливом безлічі цитокінів і факторів росту. Важливе значення має група чинників, що об'єднуються в систему остеопротегерин, активатор рецептора ядерного фактора кВ (RANK) та його ліганд (RANKL). Останній, що експресується на поверхні остеобластів, зв'язується з RANK-рецептором, розташованим на клітинах-попередниках остеокластів, і індукує диференціювання та активацію остеокластів. Остеопротегерин діє як природний рецептор-пастка для RANKL, блокуючи його взаємодію з рецептором RANK, і інгібує формування зрілих остеокластів, знижуючи активність резорбції кісткової тканини [4].

© С.Б.Павлов, М.В.Кумечко, О.Б.Літвінова, Н.М.Бабенко, А.В.Гончарова

Важливу роль у метаболізмі кісткової тканини і розвитку запалення відіграють рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1 (ІЛ-1 РА) і інтерлейкін-17 (ІЛ-17). Перший є одним з найважливіших протизапальних цитокінів. Він пригнічує діяльність ІЛ-1 α і ІЛ-1 β та модулює різні імунні і запальні реакції, що пов'язані з ІЛ-1, а також бере безпосередню участь у синтезі та активації остеокластів.

ІЛ-17 проявляє виражену прозапальну активність і здатний індукувати синтез різних медіаторів запалення, тим самим сприяючи розвитку аутоімунних патологічних реакцій [5]. Крім того, він діє на остеобласти і індукує експресію RANKL, що має головне значення для остеокластогенезу [6]. Можна припустити, що між порушеннями кісткового ремоделювання і фіброзом нирки існує зв'язок, що реалізується за допомогою цитокінів, котрі одночасно впливають на кісткову тканину і тканину нирок.

Мета нашої роботи – вивчення ролі міжклітинних медіаторів ІЛ-1 РА, ІЛ-17, RANKL і остеопротегерину в механізмах регуляції метаболізму ниркової та кісткової тканин на моделі порушення ремоделювання кісткової тканини при ХХН.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих щурах самиць віком 9 міс і масою 210 ± 30 г. Тварини були розділені на дві групи по 50 у кожній. До 1-ї контрольної групи ввійшли інтактні щури, до 2-ї – тварини з експериментальною ХХН. Модель порушення ремоделювання кісткової тканини при ХХН, що розвилася з плином часу після одноразового впливу, який викликав гостру ниркову недостатність, здійснювали одноразовим введенням 50%-го розчину гліцерину в дозі 10 мл/кг [7]. Зразки нирок щурів підлягали гістологічному дослідженню. Матеріал забирали через 12 тиж після ін'єкції гліцерину, фіксували в 10%-му нейтральному формаліні, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності, в спирті з хло-

роформом, хлороформі, заливали у парафін [8]. Виготовлені зрізи товщиною 5-7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином за Ван Гізоном, аналізували в полі зору мікроскопа «Біолам-І». Мікрофотографії препаратів виконували за допомогою цифрової камери Microocular.

Порушення ремоделювання кісткової тканини контролювали за допомогою прямого вимірювання щільності кістки, яку розраховували як відношення маси кістки (грами) до її об'єму (сантиметри кубічні) [9].

Дослідження цитокінового профілю проводили через 12 тиж після ін'єкції гліцерином методом імуноферментного аналізу в сироватці крові. Кров для дослідження тварин брали з серця.

Вміст ІЛ-17 і ІЛ-1 РА визначали за допомогою наборів реагентів «Вектор-Бест» (Росія), ampli-sRANKL – «Biomédica» (Австрія), остеопротегерину – «eBioscience» (Австрія).

Математичну обробку результатів проводили із застосуванням пакета статистичного аналізу Statistica 6.0. Відмінності вважали вірогідними при $P < 0,05\%$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При гістологічному дослідженні нирок щурів з експериментальною ХХН виявлені істотні структурні зміни, що свідчать про порушення видільної функції органа. Так, у всіх зразках відзначається дифузне венозно-капілярне повнокров'я, в розширених судинах спостерігаються еритростази, поділ крові на плазму і формені елементи, крайове стояння лейкоцитів, що є проявом порушень кровонаповнення органа та реологічних властивостей крові. Набряк інтерстицію слабкий або помірний (рис. 1).

Будова більшості ниркових клубочків збережена, але на деяких ділянках вони мають неправильну полігональну форму (ознаки набряку) або знаходяться в стані атрофії. Також у кірковій речовині відзначаються

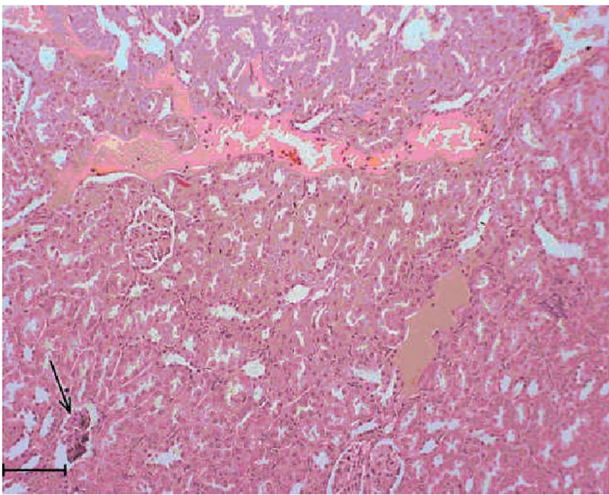


Рис. 1. Мікрофотографія тканини нирки щура. Переповнена кров'ю вена. Розшарування крові на плазму і формені елементи. Помірний набряк інтерстицію. Атрофія клубочка (стрілка). Фарбування гематоксиліном та еозином. Лінійний масштаб 90 мкм. Збільшення у 100 разів

осередки нефросклерозу, де в деструктивно змінений нирковий епітелій, поступово його замінюючи, проростає сполучна тканина з численними фіброblastами з великими, яскраво забарвленими функціонально активними ядрами. У фіброзно змінених ділянках зустрічаються відкладення уробіліну жовтого або бурого кольору (рис. 2).

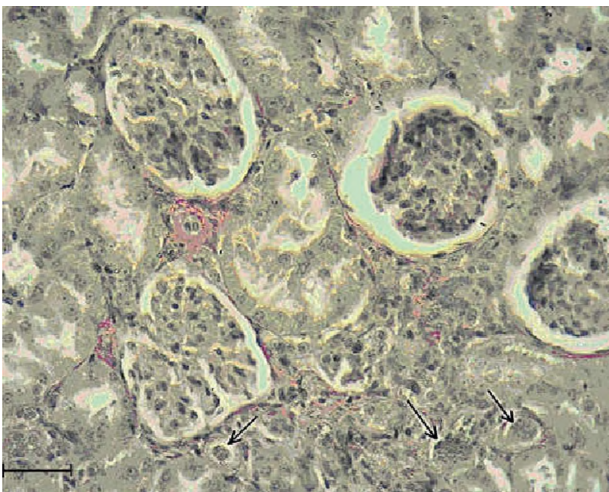


Рис. 2. Мікрофотографія тканини нирки щура. Осередок нефросклерозу. Сполучна тканина з високою щільністю фіброblastів. Відкладення уробіліну (стрілка). Фарбування за Ван Гізоном. Лінійний масштаб 40 мкм. Збільшення у 100 разів

Таким чином, гістологічне дослідження підтверджує, що одноразове введення розчину гліцерину щурам порушує видільну функцію вирок і формує ХХН.

При дослідженні щільності кістки було відзначено її достовірне зниження в групі тварин з ХХН ($1,431 \pm 0,038$ г/см³) порівняно з інтактними тваринами ($1,618 \pm 0,038$ г/см³), що підтверджує порушення ремоделювання кістки в цій групі.

Як видно з рис. 3, у тварин дослідної групи вміст у крові цитокінів ІЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл) та ІЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл) був вірогідно вищим, ніж у інтактних тварин ($2,529 \pm 0,132$ і $28,166 \pm 0,526$ пг/мл відповідно; $P < 0,05$). Також вміст остеопротегерину ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) і RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) були достовірні вище від значень контрольної групи ($21,588 \pm 0,763$ і $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л відповідно; $P < 0,05$). Вміст ІЛ-1 РА підвищувався на 66%, RANKL – на 40%, остеопротегерину – на 31%, ІЛ-17 – на 21%.

Найбільш значним було збільшення вмісту протизапального цитокіну ІЛ-1 РА, що є компенсаторною реакцією на підвищення концентрації ІЛ-1. Одночасно з цим зростала концентрація прозапального ІЛ-17, який стимулює продукцію багатьох цитокінів, у тому числі і ІЛ-1. Такий дисбаланс у вмісті про- та протизапальних цитокінів у групі тварин із ХХН є характерним для зрушень у системі Т-клітинної імунної відповіді, що свідчить про розвиток хронічного запалення [10]. При цьому збільшувався вміст RANKL у сироватці крові і його природного антагоніста остеопротегерину. RANKL є основним стимулювальним фактором в утворенні зрілих остеокластів, і збільшення експресії RANKL призводить до резорбції кісткової тканини, що відповідає зниженню щільності кістки в групі тварин з порушенням її ремоделювання. Це підтверджує дані дослідників про те, що запальні процеси спричиняють втрату кісткової маси, що, в свою чергу, свідчить про головну роль таких запальних цитокінів, як

ІЛ-1, у формуванні остеокластів [11]. ІЛ-1, активуючи експресію RANKL на поверхні остеобластів, регулює метаболізм кісткової тканини за рахунок стимуляції остеокластогенезу. Водночас він може пригнічувати утворення остеокластів за допомогою збільшення виробництва остеопротегерину [12, 13]. Таким чином, збільшення вмісту останнього у групі тварин з ХХН, у якій підтверджено зниження мінеральної щільності кістки, можна розглядати як компенсаторну реакцію на підвищення активності остеокластів. Крім того, підвищення вмісту остеопротегерину у цих тварин може свідчити про активацію Т-клітин, що являє собою гомеостатичну відповідь на запалення при ХХН. Ці припущення підтверджуються дослідженнями низки авторів, які надали докази зв'язку між

остеопротегерином і кістковими порушеннями за умов хронічного запалення [14, 15], а також негативною кореляцією вмісту остеопротегерину зі вмістом протизапального цитокіну ІЛ-1 РА у тварин із ХХН (таблиця).

У нашому дослідженні збільшення вмісту прозапального цитокіну ІЛ-17 було найменш значним. Імовірно, що і його вплив на експресію RANKL та остеопротегерину неістотний. Таке припущення знаходить підтвердження в літературних даних, де дефіцит ІЛ-17 не знижує кісткову резорбцію [16]. Водночас у групі тварин із ХХН була виявлена позитивна кореляція між RANKL та ІЛ-17, це може пояснюватися тим, що останній індукує експресію RANKL у цій групі.

Можна припустити, що зміна напрямів кореляцій між вмістом цитокінів ІЛ-1 РА

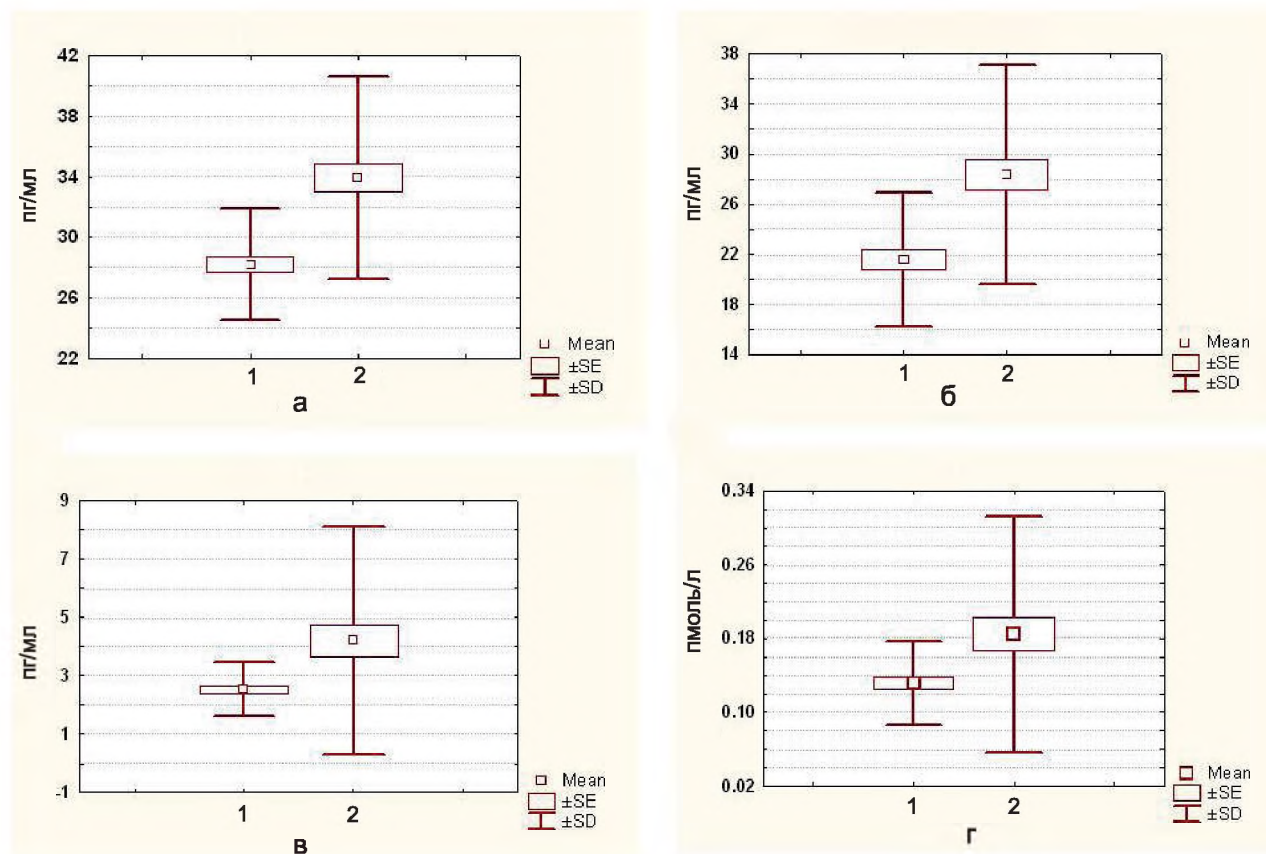


Рис. 3. Вміст цитокінів:

1 – контрольна група; 2 – група з моделлю порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок (ХХН); а – вміст інтерлейкіну-17, б – вміст остеопротегерину, в – вміст рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1, г – вміст ліганду активатора рецептора ядерного фактора kB

Кореляції показників між собою в групах тварин

Дослідження	Контрольна група			Група з моделлю порушення ремоделювання кісткової тканини при хронічній хворобі нирок		
	Інтерлейкін-17	Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	Остеопротегерин	Інтерлейкін-17	Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	Остеопротегерин
Рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1	0.41*	-	-	-0.58*	-	-
Остеопротегерин	0.02	-0.25	-	0.08	-0.31*	-
Ліганд активатора рецептора ядерного фактора kB	-0.003	-0.37*	-0.09	0.51*	0.59*	-0.29*

* P < 0,05

та ІЛ-17 у контрольній та дослідній групах відображає порушення балансу регуляторних механізмів при розвитку хронічного запалення, яке характеризується активністю прозапальних цитокінів і недостатньою дією їх інгібіторів і антагоністів. Це знаходить підтвердження в нашому дослідженні, де була негативна кореляція між прозапальним ІЛ-17 і протизапальним ІЛ-1 РА. Водночас середні значення вмісту даних цитокінів у дослідній групі зростають. Дисбаланс у вмісті про- та протизапальних цитокінів також відображається на зміні напрямку кореляції між вмістом RANKL та ІЛ-1 РА зі зворотною в контрольній групі на пряму в групі тварин із ХХН при зростанні середніх значень вмісту цитокінів.

Було виявлено слабку негативну кореляцію між RANKL і остеопротегерином. Незначний зв'язок може свідчити про те, що в регуляції їх синтезу задіяно безліч різних процесів, вплив яких не завжди відображає вміст цих цитокінів у сироватці крові. Хоча виявлених кореляцій недостатньо для встановлення причинно-наслідкових зв'язків, вони є важливим індикатором змін у системі регуляції ремоделювання кісткової тканини і розвитку запалення. Поява нових зв'язків і зміна їх напрямів між парами міжклітинних медіаторів може бути проявом одного з механізмів ремоделювання кісткової тканини при ХХН. Порушення балансу між про- та проти-

запальними цитокінами відіграє значну роль як у ремоделюванні кісткової тканини, так і в фіброзуванні тканини нирки. Міжклітинні медіатори є сполучною ланкою між порушеннями кісткового метаболізму і нирковою патологією.

С.Б.Павлов, М.В.Кумечко, О.Б.Литвинова, Н.М.Бабенко, А.В.Гончарова

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Целью нашей работы было изучение роли межклеточных медиаторов – рецепторного антагониста интерлейкина-1 (ИЛ-1 РА), интерлейкина-17 (ИЛ-17), лиганда активатора рецептора ядерного фактора kB (RANKL) и остеопротегерина в механизмах регуляции метаболизма почечной и костной тканей на модели нарушения ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек (ХБП). Было обнаружено достоверное увеличение содержания цитокинов ИЛ-1 РА ($4,207 \pm 0,546$ пг/мл), ИЛ-17 ($33,944 \pm 0,938$ пг/мл), остеопротегерина ($28,338 \pm 1,223$ пг/мл) и RANKL ($0,184 \pm 0,018$ пмоль/л) в сыворотке крови животных с нарушением костного ремоделирования при ХБП по сравнению с содержанием исследуемых цитокинов у животных контрольной группы ($2,529 \pm 0,132$ пг/мл, $28,166 \pm 0,526$ пг/мл, $21,588 \pm 0,763$ пг/мл и $0,131 \pm 0,006$ пмоль/л соответственно; $P < 0,05$). Корреляции, обнаруженные в ходе исследования, отражают взаимосвязи в системе регуляции ремоделирования костной ткани и развития воспаления при ХБП. Нарушение баланса между про- и противовоспалительными цитокинами имеет большое

значение как в развитии ХБП, так и в процессах ремоделирования костной ткани.

Ключевые слова: ремоделирование костной ткани; хроническая болезнь почек; про- и противовоспалительные цитокины.

**S.B.Pavlov, M.V.Kumechko, O.B.Litvinova,
N.M.Babenko, A.V.Goncharova**

BONE REGULATORY MECHANISMS DESTRUCTION IN EXPERIMENTAL CHRONIC KIDNEY DISEASE

The aim of our study was to investigate the role of intercellular mediators – interleukin-1 receptor antagonist (IL-1 RA), interleukin-17 (IL-17), receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in the mechanisms of metabolic regulation of renal and bone tissue on model of violations of bone remodeling in chronic kidney disease (CKD). It was found a significant increase in the content of cytokines IL-1 RA ($4,207 \pm 0,546$ pg/ml), IL-17 ($33,944 \pm 0,938$ pg/ml), osteoprotegerin ($28,338 \pm 1,223$ pg/ml) and RANKL ($0,184 \pm 0,018$ pmol/l) in the serum of animals in violation of bone remodeling in CKD compared with the contents of the studied cytokines in animals in the control group ($2,529 \pm 0,132$ pg/ml, $28,166 \pm 0,526$ pg/ml, $21,588 \pm 0,763$ pg/ml and $0,131 \pm 0,006$ pmol/l, respectively) ($P < 0.05$). The obtained correlations reflect the relationship between regulation of bone remodeling and the development of inflammation in CKD. The imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine plays an important role both in the development of CKD and in processes of bone remodeling.

Key words: bone remodeling; chronic kidney disease; pro- and anti-inflammatory cytokines.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

REFERENCES

1. Kraydashenko OV, Dolinnaya MA. The role of biomarkers in the assessment of the nature of kidney damage in patients with hypertension. *Clin Nephrol* 2014; 3: 23–5. [Russian].
2. Kairaitis LK, Harris DC. Tubular-interstitial interactions in proteinuric renal diseases. *Nephrology*. 2001; 6: 198–207.
3. Gal-Moscovici A, Sprague SM. Bone health in chronic kidney disease mineral and bone disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2007; 14 (1): 27–36.
4. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop*. 2012; 3 (11): 175–81.
5. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441: 235–8.
6. Zwerina K, Koenders M, Hueber A, Marijnissen RJ, Baum W, Heiland GR, Zaiss M, McLnnes I, Joosten L, van den Berg W, Zwerina J, Schett G. Anti IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF- α -mediated murine arthritis by modulation of the T-cell balance. *Eur J Immunol*. 2012; 42 (2): 413–23.
7. Kondakov II, Topchii II, Kirienko OM. Influence of glycerol on functional-morphological indicators of kidneys at modelling renal insufficiency in rats. *Ukr J Nephrol Dialysis*. 2013; 3 (39): 14–20. [Ukrainian].
8. Sarkisov D.S., Perova J.L. *Microscopic technique*. M: Medicine; 1996. [Russian].
9. Podkovkin V.G., Ivanov D.G., Ivanov G.A. The effect of magnetic field on the bone tissue status in rats with high level bone resorption. *Adv Curr Nat Sci*. 2008; 7: 13–6. [Russian].
10. Moss RB, Moll T, El-Kalay M, Kohne C, Soo Hoo W, Encinas J, Carlo DJ. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*. 2004; 4 (12): 1887–96.
11. Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, Kim N. The Mechanism of Osteoclast Differentiation Induced by IL-1. *The Journal of Immunology*. 2009; 183 (3): 1862–70.
12. Lambert C, Oury C, Dejardin E, Chariot A, Piette J, Malaise M, Merville MP, Franchimont N. Further Insights in the Mechanisms of Interleukin-1 β Stimulation of Osteoprotegerin in Osteoblast-Like Cells. *Journal Of Bone And Mineral Research*. 2007; 22 (9): 1350–61.
13. Lee YM, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *International Immunology*. 2010; 22 (10): 805–16.
14. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Gabriel M, Obrist P, Wolf AM, Tilg H. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut*. 2005; 54 (4): 479–87.
15. Nascimento M.M., Hayashi S.Y., Riella M.C., Lindholm B. Elevated levels of plasma osteoprotegerin are associated with all-cause mortality risk and atherosclerosis in patients with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Braz J Med Biol Res*. 2014; 47 (11): 995–1002.
16. Tunyogi-Csapo M, Kis-Toth K, Radacs M, Farkas B, Jacobs JJ, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption. *Arthritis Rheum*. 2008; 58 (8): 2397–408.

*Матеріал надійшов
до редакції 10.12.2015*