

Система остеопротегерин (OPG) – лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL) при диабетической нейроостеоартропатии и облитерирующем атеросклерозе артерий нижних конечностей

М.В. Ярославцева, И.Н. Ульянова, Г.Р. Галстян

ФГУ Эндокринологический Научный Центр Росмедтехнологий
(дир. – акад. РАН и РАМН И.И. Дедов)

Диабетическая нейропатия (ДН) является одним из наиболее распространенных осложнений сахарного диабета (СД). Из-за отсутствия единых диагностических критериев ДН ее распространенность колеблется от 35 до 90% и зависит от возраста больного, длительности и степени компенсации СД. Так, при длительности СД более 5 лет распространенность ДН не превышает 15%, а при длительности более 30 лет – достигает 50–90% [1]. Она практически одинаково часто обнаруживается у больных СД1 и СД2 [2].

Наиболее характерной формой поражения нижних конечностей при ДН является синдром диабетической стопы, обусловленный комплексом изменений периферической нервной системы (дистальная полинейропатия) и артериального русла (облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, склероз Менкеберга), который грозит развитием язвенно-некротических процессов и гангрены стопы.

Дистальная ДН ассоциируется с медиакальцинозом артерий нижних конечностей, значительным снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ) стопы и высокой частотой сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В большинстве случаев эти изменения наблюдаются у пациентов с диабетической нейроостеоартропатией (стопа Шарко), характеризующейся локальным остеопорозом стоп и в 90% случаев – обызвествлением сосудов [3].

Диабетическая нейроостеоартропатия чаще всего поражает кости и суставы стоп и, по сути, проявляется разобщением процессов синтеза и резорбции костной ткани. Возрастает содержание маркеров костной резорбции – пиридинолина и дезоксипиридинолина, а также экскреция гидроксипролина. В острой фазе диабетической нейроостеоартропатии значительно повышается уровень костного изофермента щелочной фосфатазы [4–6]. Существенно увеличивается

также уровень С-концевого телопептида коллагена I типа, что свидетельствует о преобладании резорбтивных процессов [7]. Важно отметить связь между нарушением метаболизма в костной ткани и медиакальцинозом артерий нижних конечностей.

Склероз Менкеберга является следствием вегетативной нейропатии; носит неатеросклеротический характер поражения средних и крупных артерий нижних конечностей. Патоморфологически обнаруживается обызвествление (кальциноз) и утолщение средней оболочки (меди) артерий. Диаметр просвета сосудов не уменьшается, но их стенки теряют эластичность, становятся ригидными, что резко снижает адаптационные способности кровообращения в конечностях [8]. Выявляемый рентгенологически медиакальциноз артерий нередко ошибочно принимают за облитерирующий атеросклероз. Обызвествление стенок артерий может обнаруживаться и у лиц без нарушения углеводного обмена, причем с возрастом частота возрастает (от 5% у молодых до 37% у пожилых). При СД склероз Менкеберга выявляется в среднем в 3 раза чаще, чем у лиц с нормальным углеводным обменом.

Кальцификации могут подвергаться различные слои сосудистой стенки, включая медию при склерозе Менкеберга и интиму при атеросклерозе. Кальцификация не связана с формированием атером. Однако между медиакальцинозом и частотой ССЗ существует тесная связь.

Поиск связующего звена между повышенной резорбцией костной ткани, медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей привел к выяснению локальных молекулярно-биологических механизмов взаимодействия остеопротегерином (OPG) и лигандом рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), принадлежащих к семействам лигандов и рецепторов фактора некроза опухолей (TNF). Эти

соединения играют ключевую роль в формировании, дифференцировке и активности клеток костной ткани. Экспрессия RANKL и остеолит индуцируются теми же факторами, что и кальциоз гладкомышечных клеток средней оболочки артерий. OPG экспрессируется также в атеросклеротических бляшках [3, 9]. Механизм, посредством которого изменение скорости кровотока индуцирует патологические процессы в костных клетках, неизвестен, однако система OPG/RANKL играет важную роль в процессах как кальцификации артерий, так и развитии локальной остеопении [10, 11].

Все это подчеркивает актуальность изучения этой системы при синдроме диабетической стопы, при которой дистальная полинейропатия, медиакальциноз, облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей и нейроостеоартропатия носят комплексный и прогрессирующий характер.

Система OPG/RANKL

В 1997 г. в трех разных лабораториях был выделен белок, играющий важную роль в биологии костной ткани. Белок, выделенный из клеток кишечника крысы [12], оказался гликопротеином, гомологичным членом суперсемейства TNF. Повышение биосинтеза этого белка у мышей сопровождалось ростом его концентрации в крови и развитием тяжелого остеопетроза в бедренной кости и позвонках. Одновременно наблюдалось значительное снижение количества остеокластов (ОК). При подкожном введении этот белок увеличивал костную массу животных и препятствовал ее потере после овариэктомии. Он получил название «остеопротегерин» (OPG).

В то же время из среды культивирования фибробластов человека был выделен гепарин-связывающий белок, способный тормозить образование ОК [13]. Авторы назвали его «фактором, ингибирующим остеокластогенез» (OCIF). В том же году Tan и соавт. [14] идентифицировали новый член семейства рецепторов TNF, который по строению и биологической активности оказался идентичным OPG [14–16].

Открытие OPG значительно ускорило выделение и двух других белков, входящих в число важнейших компонентов, контролирующих резорбцию кости в физиологических и патологических условиях. Один из них, получивший название лиганда OPG (RANKL), является ключевым фактором активации ОК. Другой, обозначаемый RANK, представляет собой рецептор ОК, активация которого после связывания с RANKL стимулирует резорбирующую активность этих клеток. Полагают, что характер ремоделирования костной ткани во многом определяется соотношением продукции OPG и RANKL. Так, преостеобласты (преОБ) в большей степени экспрессируют RANKL и в меньшей степени – OPG.

Повышенное соотношение OPG/RANKL способствует образованию и активации ОК. Когда остеобласты (ОБ) приобретают зрелый фенотип, отношение OPG/RANKL уменьшается, и параллельно снижается стимуляция ОБ остеокластогенеза [17].

OPG, связывая RANKL, предотвращает активирующее влияние последнего на RANK ОК, что снижает как остеокластогенез, так и резорбирующую ОК.

Таким образом, OPG является ложным рецептором RANKL. Экспрессия OPG обнаружена во многих тканях (легкие, сердце, почки, печень, желудок, кишечник, головной и спинной мозг, щитовидная железа и кости), но за исключением угнетения дифференцировки и активности ОК, его роль OPG пока неизвестна [12, 18]. Однако нокаут гена OPG у мышей приводит не только к тяжелому остеопорозу и резорбции кости, но и к глубокой кальцификации крупных артерий, а также выраженной пролиферации интимы и меди сосудов [19].

Наибольшая экспрессия RANKL наблюдается в костях, костном мозге и лимфоидной ткани (лимфатические узлы, вилочковая железа, селезенка, печень плода, пейеровы бляшки). Основная его роль в костной ткани – стимуляция дифференцировки и активности ОК и подавление апоптоза ОК. В отсутствии RANKL у мышей наблюдается тяжелый остеопетроз, нарушается прорезывание зубов, полностью отсутствуют ОК, нарушается ранняя дифференцировка Т- и В-клеток, лимфатических узлов и тимуса [20, 21].

Рекомбинантный OPG человека (pOPGч) обладает антирезорбтивным действием как *in vitro*, так и при подкожном введении животным с остеопорозом. P.J.Bekker и соавт. [22] провели первое клиническое рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование 52 женщин в постменопаузе, которым вводился pOPGч. Уже к 12-му часу после однократного подкожного введения препарата наблюдалась значимое снижение уровня С-концевого телопептида коллагена I типа в моче. Максимальное снижение этого показателя (примерно на 80%) отмечено на 4-й день после инъекции pOPGч в дозе 3 мг/кг. Уровень костного изофермента щелочной фосфатазы (маркера костеобразования) не менялся в течение 3 недель после введения изучаемого препарата, а к 6-й неделе – снижался на 30%. Действие препарата после однократного введения сохранялось более 6 недель и не сопровождалось заметными побочными эффектами [22]. Отдаленные эффекты OPG в отношении МПКТ, частоты переломов и состояния сердечно-сосудистой системы, требуют дальнейшего изучения. В то же время применение OPG открывает широкие перспективы лечения остеопороза, а возможно, и других заболеваний, сопровождающихся повышенной костной резорбцией.

Система OPG/RANKL: связь между повышенной резорбцией костной ткани, медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

Предполагается, что обызвествление артерий и снижение МПКт при ДН связаны с изменениями скорости кровотока вследствие нарушения симпатической иннервации сосудов. Однако механизм связи между снижением эластичности сосудов и увеличением перфузии костной ткани и остеолизом, до сих пор не изучен.

Simonet и соавт. [12] обнаружили выраженную экспрессию OPG в меди крупн. артерий. В дальнейших исследованиях *in vitro* была выявлена продукция OPG гладкомышечными клетками артерий [23] и эндотелиоцитами [24]. У мышей с дефицитом OPG, наряду с обызвествлением и аневризмами крупн. артерий, рано развивался остеопороз, возникали множественные переломы и опасная для жизни гиперкальциемия [19]. У потомства OPG-дефицитных мышей, скрещенных с животными, которым в пренатальном периоде был внедрен ген OPG, остеопороз и кальциноз артерий отсутствовали. Таким образом, было доказано, что дефицит OPG является причиной обоих патологических процессов [25].

Дальнейшие доказательства роли OPG в качестве модулятора состояния сосудов были получены Browner и соавт. [26]. При обследовании 490 пожилых женщин оказалось, что у больных СД концентрация OPG в сыворотке в среднем была на 30% выше, чем у женщин без СД. В группе больных с СД наблюдалась более высокая смертность от ССЗ. У женщин с наиболее высокими концентрациями OPG в сыворотке относительный риск смерти от ССЗ возрастал более чем в 4 раза. Показано также, что концентрация OPG в сыворотке у мужчин с ишемической болезнью сердца (ИБС) или СД выше, чем у мужчин без этих заболеваний. Концентрация OPG коррелировала с общей смертностью и смертностью от ССЗ (с поправкой на возраст). Shopp et al. [27] исследовали группу из 522 мужчин, сопоставимых по возрасту. Концентрация OPG в сыворотке зависела от наличия и тяжести ИБС и возрастала у пациентов старшего возраста с сопутствующим СД. Предварительные результаты свидетельствовали также о снижении концентрации RANKL в сыворотке пациентов с ИБС, хотя и независимо от ее тяжести.

Иммунореактивные OPG и RANKL выявлены в сосудистой стенке при ранних атеросклеротических изменениях, тогда как в сформированных очагах кальцификации OPG обнаруживался по краям очагов, а RANKL – в местах отложения кальция. Важно

отметить, что повышенный уровень OPG в сыворотке коррелировал с наличием и тяжестью поражения коронарных артерий. OPG обнаруживался в неинтима вокруг скопления пенистых клеток и очагов кальцификации, которые присутствовали примерно в 15% образцов атеросклеротических бляшек из каротидных артерий и сердечных клапанов [9].

У женщин с остеопорозом и повышенными уровнями маркеров костного ремоделирования в сыворотке концентрации OPG были выше, чем у женщин того же возраста без признаков остеопороза [28]. Это позволило предположить, что возрастные концентрации OPG отражают недостаточность компенсационных механизмов в иммунной системе, способствующих обызвествлению артерий и атеросклерозу.

Кальцификация сосудов и остеопороз часто сопутствуют друг другу и имеют общие факторы риска (пожилой возраст, воспалительные заболевания, применение глюкокортикоидов, хроническая почечная недостаточность, недостаток эстрогенов, СД). На боковых поясничных рентгенограммах больных с остеопорозом позвоночника обычно выявляются плотные кальцификаты аорты, расположенные непосредственно напротив позвонков, где остеопороз наиболее выражен. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что частота остеопороза возрастает у людей с атеросклерозом, ССЗ и кальцификацией аорты. У женщин в постменопаузальном периоде кальцификация при атеросклерозе развивается, как правило, параллельно дегенеративным изменениям костей, т. е. отложение кальция в сосудах происходит одновременно с потерей кальция из скелета [11, 25, 29, 30]. Травматические переломы сопровождаются заметным увеличением экспрессии OPG и RANKL [31]. RANKL вызывает резорбцию костной ткани и в то же время способствует кальцификации гладкомышечных клеток артерий. Действие OPG оказывает протективное (скорее всего, компенсаторное) действие и в костной ткани, и в сосудистой стенке. Несмотря на антагонизм эффектов OPG и RANKL, их экспрессия в тканях при остеопении и кальцификации повышена.

Таким образом, экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о том, что система OPG/RANKL не только регулирует ремоделирование костной ткани, но и принимает участие в развитии патологии сосудов. В связи с этим приобретает актуальность разработка терапевтических исходов, направленных на увеличение концентрации OPG в костной ткани и сосудистой стенке.

Литература

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. (2003) Сахарный диабет. Руководство для врачей. М.: Универсум Паблишинг – с.263
2. Дедов И.И., Чазова Т.Е., Сунцов Ю.И. (2003) Эпидемиология сахарного диабета. Пособие для врачей. М. – с.56
3. Jeffcoate W. (2004) Vascular calcification and osteolysis in diabetic neuropathy – is RANK-L the missing link? *Diabetologia*. 47:1488-1492
4. Miazgovski T., Andrysiak-Mamos E., Pynka S., Gulinska M., Czekalski S. (1997) The evaluation of bone mineral density and selected markers of bone turnover in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Przegl Lek*; 54 (7-8): 533-539.
5. Miazgovski T., Czekalski S. (1998) A 2-year follow-up study on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int.*; 8 (5):399-403.
6. Selby P.L., Jude E.B., et al. (2000) Bone turnover markers in acute Charcot neuroarthropathy. *Diabetologia*. Sept; 44: A 275
7. Gough A., Abrahams H., Li F., Purewall T.S., Foster A.V., Watkins P.J., Moniz C., Edmonds M.E. (1997) Measurement of markers of osteoclast and osteoblast activity in Patients with acute and chronic diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabet.Med.* July; 14(7):527-531.
8. Дедов И.И., Анциферов М.Б., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю. (1998) Синдром диабетической стопы. М.: Универсум Паблишинг, – с.143
9. Shoppert M., Al-Fakhri N., Franke F., Katz N., Barth P., Maisch B., Preissner K., Hofbauer L. (2004) Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand in Monckebergs sclerosis and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism*, Vol.89, № 8, 4104-4112.
10. Abedin M., Tintut Y., Demer L. (2004) Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology*; 24; 1164-1170.
11. Hofbauer L., Shoppert M. (2001) Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *The Lancet*. Vol.358.
12. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Luthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davey E., Bucay N., Renshaw-Gregg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Boyle W.J. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89: 309-319.
13. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S. et al. (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits the osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V.234 P. 137-142
14. Tan K.B., Harrop J., Reddy M. Et al. (1997) Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*. V.204. P.35-46.
15. Шварц Г.Я. (2003) Молекулярно-биологические основы создания новых лекарственных средств для лечения остеопороза: 1. Остеопротегерин, ЛОПГ (RANKL) и RANK: физиологический механизм(ы) регуляции костной резорбции. Обзор литературы. *Остеопороз и остеопатия* №2. – с.21-22
16. Khosla S. (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 142 (12): 5050-5055
17. Беневоленская Л.И. (2003) Руководство по остеопорозу. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – с.82
18. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 39:1329-1337.
19. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.L., Simonet W.S. (1998) Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268.
20. Anderson M.A., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.S., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179.
21. Fuller K., Wong B., Fox S., Choi Y., Chambers T.J. (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J. Exp Med* 188:997-10001
22. Bekker P.J., Holloway D., Nalanishi A., et.al. (1999) Osteoprotegerin (OPG) has potent and sustained anti-resorptive activity in postmenopausal women. *J. Bone Mineral Research*; 14 (Suppl.1):S180.
23. Hofbauer L.C., Shui C., Riggs B.L., et al. (2001) Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun*; 280:334-39.
24. Malyankar U.M., Scatena M., Suchland K.L., Yun T.J., Clarc E.A., Giachecelli C.M. (2000) Osteoprotegerin is an -induced, NF- B-dependent survival factor for endothelial cells. *J. Biol.Chem*; 275: 20959-62.
25. Min H., Morony S., Sarosi I., et. al. (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp Med*; 192: 463-74.
26. Browner W.S., Lui L.Y., Cummings S.R. (2001) Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 631-37.
27. Shoppert M., Sattler ANM, Schaefer J.R., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C. (2003) Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J. Clin Endocrinol. Metabol.*, 88: 1024-1028.
28. Yano K., Tsuda E., Washida N. et al. (1999) Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*; 14:518-27.
29. Glass C., Witztum J. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*; 104:503-516.
30. Parchami F., Morrow A., Balucan J., Leitinger N., Watson A., Tintut Y., Berliner J., Demer L. (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcifications in osteoporotic patients. *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology*; 17; 680-687.
31. Kon T., Cho T.J., Aizawa T. et al. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappa B ligand (osteoprotegerin-ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J. Bone Miner. Res*; 16:1004-1014.