

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ ПАТОЛОГИИ

Проф. А. Н. Хвисьук, канд. биол. наук С. Б. Павлов, М. В. Кумечко, Н. М. Бабенко,
канд. биол. наук А. В. Гончарова, Н. Г. Семко, Л. В. Черных

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Одной из основных проблем современной нефрологии является изучение механизмов прогрессирования заболеваний почек с развитием в конечном итоге хронической почечной недостаточности. Большинство изменений, определяющих исход заболеваний почек, происходит в почечном интерстиции. Экспериментальное исследование проводилось в 2 группах белых крыс. Изучен цитокиновый профиль в сыворотке крови лабораторных животных иммуноферментным методом и проведено биохимическое определение оксипролина в моче. Исследования показали увеличение сывороточного уровня остеопротегерина и уменьшение уровня TGF- β в сыворотке крови животных в группе с хронической болезнью почек, в которой подтверждено снижение минеральной плотности костной ткани. Показано увеличение уровней свободного и связанного оксипролина в моче животных экспериментальной группы. Обнаружена положительная статистически значимая корреляция между уровнем свободного и связанного оксипролина.

Ключевые слова: межклеточные медиаторы, оксипролин, ремоделирование костной ткани, хроническая болезнь почек.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПІД ЧАС МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ НИРКОВОЇ ПАТОЛОГІЇ

Проф. О. М. Хвисьук, канд. біол. наук С. Б. Павлов,
М. В. Кумечко, Н. М. Бабенко, канд. біол. наук А. В. Гончарова,
Н. Г. Семко, Л. В. Черних

Однією з основних проблем сучасної нефрології є вивчення механізмів прогресування захворювань нирок із розвитком хронічної ниркової недостатності. Більшість змін, що визначають результат захворювань нирок, відбувається в нирковому інтерстиції. Експериментальне дослідження проводилося в 2 групах білих щурів. Вивчено цитокиновий профіль у сироватці крові лабораторних тварин імуноферментним методом та проведено біохімічне визначення оксипроліну в сечі. Дослідження довели збільшення сироваткового рівня остеопротегерину і зменшення рівня TGF- β в сироватці крові тварин у групі з хронічною хворобою нирок, в якій підтверджено зниження мінеральної щільності кісткової тканини. Показано збільшення рівнів вільного та зв'язаного оксипроліну в сечі тварин експериментальної групи. Виявлена позитивна статистично значуща кореляція між рівнем вільного та зв'язаного оксипроліну.

Ключові слова: міжклітинні медіатори, оксипролін, ремоделювання кісткової тканини, хронічна хвороба нирок.

FEATURES OF BONE METABOLISM AT MODELING IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

A. N. Khvisyuk, S. B. Pavlov, M. V. Kumechko, N. M. Babenko,
A. V. Goncharova, N. G. Semko, L. V. Chernykh

One of the problems of modern nephrology is development of a chronic renal failure owing to an illness of kidneys. Identification of mechanisms of this process is an actual task. Key pathological processes happen in interstition of kidney. Researches were conducted on model of remodeling of a bone tissue in a chronic illness of kidneys. Research was conducted in two groups of white rats. Concentration of cytokines in serum of laboratory animals was studied by ELISA. In urine biochemical determination of the hydroxyproline was performed. Our studies showed an increase of OPG levels and a decrease of the level of TGF- β 1 in the serum of the blood of animals in the group with chronic kidney disease. In that group the decrease of mineral density of bone was confirmed. Increasing the levels of free and bound hydroxyproline in urine of animals of the experimental group was observed. A positive statistically significant correlation between the level of free and bound hydroxyproline was detected.

Keywords: intercellular mediators, hydroxyproline, remodeling of bone tissue, chronic kidney disease.

Одной из основных проблем современной нефрологии является изучение механизмов прогрессирования заболеваний почек с развитием в конечном итоге хронической

почечной недостаточности. Снижение уровня клубочковой фильтрации коррелирует главным образом со степенью тубулоинтерстициальных, а не клубочковых повреждений,

и большинство изменений, определяющих исход заболеваний почек, происходит именно в почечном интерстиции [6].

В очаге воспаления макрофаги являются ключевым источником цитокинов и факторов роста: интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), фактора роста фибробластов (FGF), трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и т. п. [9]. Под влиянием этих медиаторов происходит привлечение в интерстициальную ткань фибробластов. Фибробласты синтезируют компоненты внеклеточного матрикса, приводящие к чрезмерному накоплению коллагена и фиброзу [5]. Об активности процессов катаболизма коллагена судят по количественному содержанию специфичного для коллагена белка — оксипролина в моче [10].

TGF- β является одним из ключевых профибротических цитокинов, который играет важную роль в патогенезе фиброза почек путем активации каскада внутриклеточных сигнальных путей [8].

Остеопротегерин (OPG) — член семейства TNF-рецепторов, регулирующий костную массу за счет ингибирования дифференцировки и активации остеокластов. OPG является важным прогностическим фактором у пациентов с заболеваниями почек, т. к. в дополнение к регулированию обмена костной ткани этот цитокин ингибирует кальциноз сосудов и модулирует воспаление в сосудистой стенке [2].

Цель работы — изучение особенностей костного метаболизма в эксперименте на модели нарушения ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек с помощью оксипролина, а также межклеточных медиаторов OPG и TGF- β .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование проводилось в 2 группах (по 50 животных) белых крыс самок в возрасте 9 мес. массой 210 ± 30 г. Первая группа — контрольная, была сформирована из интактных животных. Вторая экспериментальная группа состояла из крыс с нарушением ремоделирования костной ткани при хронической болезни почек (ХБП).

Модель экспериментальной ХБП, развившейся с течением времени после однократного воздействия, которое вызвало острую почечную недостаточность, осуществляли путем однократного введения 50 % раствора глицерина в дозе 10 мл/кг массы тела животного. Нарушение ремоделирования костной ткани контролировали с помощью прямого измерения плотности кости, которую рассчитывали как отношение массы кости (г) к объему данной кости (см³). Объем кости определяли по объему вытесненной жидкости. Определение свободного (ОП_{своб.}) и связанного оксипролина (ОП_{связ.}) в моче проводили согласно методике П. Н. Шараева [1]. Исследование цитокинового профиля проводилось через 12 нед. после инъекции глицерином методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови. Уровень OPG определяли с помощью набора реагентов eBioscience (Австрия). Определение уровней TGF- β производилось с помощью набора BioVendor (Чехия).

Математическая обработка результатов была проведена с помощью пакета статистического анализа Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании плотности кости было отмечено ее достоверное снижение в группе животных с ХБП ($1,431 \pm 0,038$ г/см³) по сравнению с интактными животными контрольной группы ($1,618 \pm 0,038$ г/см³), что подтверждает нарушения ремоделирования костной ткани в этой группе.

Наши исследования показали увеличение сывороточного уровня OPG в группе с ХБП, в которой подтверждено снижение минеральной плотности костной ткани (табл. 1).

В настоящее время нет однозначной интерпретации причин повышения уровня OPG при ХБП. Часто элевация уровня OPG объясняется редукцией величины скорости клубочковой фильтрации [7]. Некоторыми исследователями была показана роль OPG в качестве ингибитора кальциноза сосудов у больных с ХБП, следовательно, высокие

Уровни цитокинов в контрольной и экспериментальной группах

Цитокины	Группа	
	Контроль	Модель хронической болезни почек
OPG, пг/мл	21,588±0,763	28,338±1,223*
TGF-β1, нг/мл	26,331±0,62	22,863±0,557*
ОП _{своб.} , мг/сут	0,061±0,007	0,101±0,015*
ОП _{связ.} , мг/сут	0,141±0,016	0,174±0,029

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

уровни этого цитокина могут быть истолкованы как попытки компенсировать продолжающийся процесс кальцификации [3]. В то же время повышенное содержание OPG является фактором риска смертности от сердечно-сосудистых патологий при заболеваниях почек [11]. Вопрос о том, представляет ли собой рост уровня OPG компенсаторный механизм для предотвращения дальнейшего повреждения артерий или является просто маркером начала сосудистого процесса кальцификации, остается невыясненным. Можно также предположить, что повышение уровня остеопротегерина, основная роль которого состоит в регулировании остеокластической резорбции, представляет собой гомеостатический ответ на воспаление при ХБП.

В нашем исследовании уровень TGF-β в экспериментальной группе был достоверно ниже показателей животных из контрольной группы (табл. 1). Снижение уровня TGF-β,

являющегося одним из ключевых факторов прогрессирующего почечного фиброза, вероятно, связано с действием макрофагов, участвующих в процессе растворения осажденного внеклеточного матрикса ткани почки [4].

В группе животных с ХБП наряду с ростом уровня свободного оксипролина, отражающего распад коллагена, наблюдался рост содержания связанного оксипролина, который является индикатором биосинтеза коллагена. Этот факт свидетельствует о нарушении динамического равновесия между интенсивностью синтеза и степенью распада коллагена в сторону относительного превалирования процессов его деградации, что может отражать как процесс развития фиброза почки, так и резорбцию костной ткани. Наше предположение подтверждает обнаруженная нами положительная статистически значимая корреляция между уровнем свободного и связанного оксипролина (рис. 1).

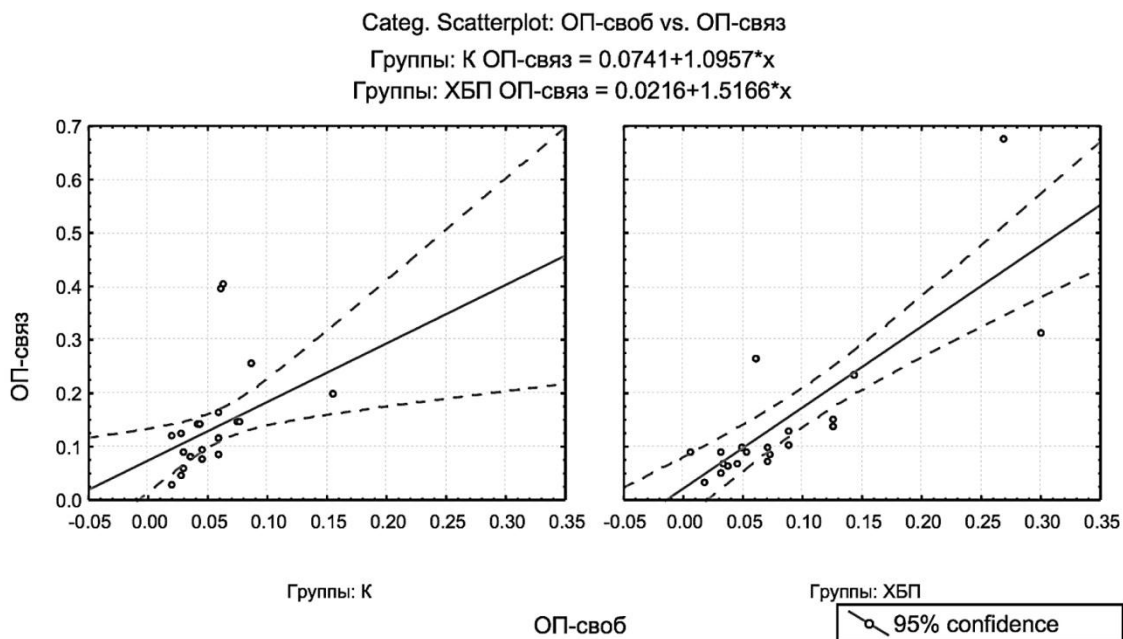


Рис. 1. Корреляция между уровнями свободного и связанного оксипролина в группах животных

Было обнаружено, что OPG и TGF- β слабо и обратно коррелируют друг с другом в контрольной ($r = -0,12$) и в экспериментальной ($r = -0,22$) группах, что может свидетельствовать о том, что в регуляции синтеза этих цитокинов задействовано множество различных процессов, влияние которых не всегда отражают их сывороточные уровни.

ВЫВОДЫ

1. Изученные изменения концентраций межклеточных медиаторов свидетельствуют об их важной роли как в развитии воспаления, приводящего к почечному фиброзу, так

и в регуляции процессов костного ремоделирования.

2. Повышение содержания уровней свободного и связанного оксипролина, по-видимому, свидетельствует о нарушении динамического равновесия между деструкцией и биосинтезом коллагена, что может отражать как процесс развития фиброза почки, так и резорбцию костной ткани.

Перспективным направлением дальнейших исследований может стать разработка методов адекватной патогенетической терапии как при заболеваниях почек, так и при других хронических патологиях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Определение свободного и связанного оксипролина в моче / П. Н. Шараев, Е. А. Ботникова, В. М. Иванова [и др.] // Лаб. дело. — 1990. — № 12. — С. 23–25.
2. Correlates of osteoprotegerin and association with aortic pulse wave velocity in patients with chronic kidney disease / J. J. Scialla, M. B. Leonard, R. R. Townsend [et al.] // CJASN. — 2011. — Vol. 6 (11). — P. 2612–2619.
3. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin / M. Schoppet, M. M. Kavurma, L. C. Hofbauer, C. M. Shanahan // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2011. — Vol. 407. — P. 103–107.
4. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease / Y. Wang, Y. P. Wang, G. Zheng [et al.] // Kidney Int. — 2007. — Vol. 72 (3). — P. 290–299.
5. Farris A. B. Renal interstitial Fibroses: mechanisms and evaluation / A. B. Farris, R. B. Colvin // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. — 2012. — Vol. 21. — P. 289–300.
6. Imig J. D. Immune and Inflammatory Role in renal Diseases / J. D. Imig, M. J. Ryan // Compr. Physiol. — 2013. — Vol. 3 (2). — P. 957–976.
7. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure / J. J. Kazama, T. Shigematsu, K. Yano [et al.] // Am J. Kidney Dis. — 2002. — Vol. 39 (3). — P. 525–532.
8. Lan H. Y. Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation / H. Y. Lan // Int. J. Biol. Sci. — 2011. — Vol. 7. — P. 1056–1067.
9. Lee S. B. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis / S. B. Lee, R. Kalluri // Kidney Int. Suppl. — 2010. — Vol. 119. — P. 22–26.
10. McAnulty R. J. Methods for measuring hydroxyproline and estimating in vivo rates of collagen synthesis and degradation / R. J. McAnulty // Methods Mol. Med. — 2005. — Vol. 117. — P. 189–207.
11. Plasma osteoprotegerin, arterial stiffness, and mortality in normoalbuminemic Japanese hemodialysis patients / A. Nakashima, J. J. Carrero, A. R. Qureshi [et al.] // Osteoporos Int. — 2011. — Vol. 22. — P. 1695–1701.