

Система остеопротегерин (OPG) – лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL) у пациентов с сахарным диабетом, медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей

М.В. Ярославцева, И.Н. Ульянова, Г.Р. Галстян, А.В. Ильин, Л.В. Никанкина, О.В. Ремизов, И.И. Дедов

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, Москва
(директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Цель исследования. Изучить систему OPG/RANKL у пациентов с сахарным диабетом, медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей.

Материалы и методы. Обследовано 79 человек. Из них 20 пациентов с выраженной диабетической нейропатией (ДН) и медиакальцинозом артерий нижних конечностей (группа 1). 29 пациентов с сахарным диабетом (СД) и клиническими проявлениями облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (группа 2). Группу контроля составили 30 человек без нарушения углеводного обмена (3 группа). В качестве маркеров костеобразования в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли уровень активности костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ), OPG и RANKL, наборами Alkphase-B, Metra biosystems, США; Osteoprotegerin, Biomedica, Австрия; sRANKL, Biomedica, Австрия, соответственно. Пациентам проводилась цифровая рентгенография пораженных суставов в прямой и боковой проекциях на аппарате «Axiom Iconos R 200» (Siemens, Германия). Для изучения минеральной плотности костной ткани (МПКТ) проводилось денситометрическое исследование с помощью двойной энергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат «Expert 1188», Lunar, США). Ультразвуковое дуплексное сканирование артерий нижних конечностей проводилось на аппарате «Sonos-5500» (Agilent, США).

Результаты. Выявлено достоверное повышение OPG у пациентов с СД по сравнению с группой контроля ($p<0,0001$). Содержание OPG обратно коррелировало с RANKL ($r=-0,68$; $p<0,001$) у пациентов 1 группы. Повышение уровня общего холестерина (ХС) отмечалось у пациентов с СД по сравнению с группой контроля ($p<0,05$). Выявлена корреляция значений ХС ($r=0,3$; $p<0,0003$) и ТГ ($r=0,2$; $p<0,001$) с значениями OPG в группах больных СД. Выявлена обратная корреляция между значениями МПКТ и уровнем OPG в 1 группе ($r=-0,6$; $p<0,002$). Выявлена корреляционная связь между значениями КЩФ и значениями OPG ($r=0,2$; $p<0,01$) и RANKL ($r=0,21$; $p<0,01$) у больных СД.

Заключение. Система OPG/RANKL принимает участие в формировании медиакальциноза и кальцификации внутренней оболочки артерий нижних конечностей.

Ключевые слова. Остеопротегерин, RANKL, медиакальциноз, облитерирующий атеросклероз.

The system of osteoprotegerin (OPG)/ligand of NF- κ B receptor activator (RANKL) in patients with diabetes mellitus, medial calcinosis and obliterating atherosclerosis of lower leg arteries

M.V. Yaroslavtseva, I.N. Ulyanova, R.G. Galstyan, A.V. Il'in, L.V. Nikankina, O.V. Remizov, I.I. Dedov

Aim. To study the OPG/RANKL system in patients with diabetes mellitus, medial calcinosis and obliterating atherosclerosis of lower leg arteries.

Materials and methods. The study enrolled 79 patients including 20 with manifest diabetic neuropathy (DN) and medial calcinosis of lower leg arteries (group 1). 29 patients with diabetes mellitus (DM) and clinical manifestations of obliterating atherosclerosis of lower leg arteries comprised group 2. The control group 3 consisted of 30 subjects without disturbances of carbohydrate metabolism. Immunoassays with Alkphase-B (Metra biosystems, USA), Osteoprotegerin (Biomedica, Austria), and sRANKL (Biomedica, Austria) kits were used to detect serum markers of bone formation (alkaline phosphatase (AP), OPG, and RANKL respectively). The patients underwent examination by digital X-ray of affected joints in frontal and lateral projections using an Axiom Iconos R 200 apparatus (Siemens, Germany). Bone mineral density (BMD) was measured by dual energy X-ray absorptiometry (Expert 1188, Lunar, USA). Ultrasound duplex scanning of lower leg arteries was performed with Sonos-5500 (Agilent, USA).

Results. OPG levels in diabetic patients were significantly higher than in controls ($p<0,0001$). In group 1, they negatively correlated with RANKL ($r = 0,68$; $p<0,001$). Total cholesterol (TC) in diabetic patients was higher than in controls ($p<0,05$). In the former, TH and TG levels correlated with OPG concentration ($r = 0,3$; $p<0,0003$ and $r = 0,2$; $p<0,001$ respectively). Inverse correlation between BMD and OPG ($r = -0,61$; $p<0,002$) was documented in group 1. AP in diabetic patients correlated with OPG ($r = 0,2$; $p<0,01$) and RANKL ($r = 0,21$; $p<0,01$).

Conclusion. The OPG/RANKL system participates in the development of medial calcinosis and calcification of arterial intima in the lower extremities.

Key words: osteoprotegerin, RANKL, medial calcinosis, obliterating atherosclerosis.

Диабетическая нейропатия (ДН) ассоциируется с медиакальцинозом артерий нижних конечностей и значительным снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ) [1]. Выявляемый рентгенологически медиакальциноз артерий нередко ошибочно принимают за облитерирующий атеросклероз, что приводит к неверной тактике лечения данных больных. Кальцификации могут подвергаться различные слои сосудистой стенки, включая медию при медиакальцинозе и интиму при атеросклерозе (рис. 1). Обызвестление 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 сахарном диабете (СД) медиакальциноз выявляется в среднем в 3 раза чаще, чем у лиц с нормальным углеводным обменом.



Рис. 1. Схема строения сосудистой стенки

Поиск связующего звена между повышенной резорбцией костной ткани, медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей привел к выдвижению предположения, основанного на взаимодействии локальных молекулярно-биологических механизмов, в том числе между остеопротегерином (OPG) и лигандом рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), являющихся членами семейств лигандов и рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Исследования последних лет свидетельствуют о том, что они играют ключевую роль в формировании, дифференцировке и активности клеток костной ткани [2, 3, 4].

Открытие OPG значительно ускорило выделение двух других белков, входящих в число важнейших компонентов, контролирующих резорбцию кости в физиологических и патологических условиях. Так, RANKL, являясь ключевым фактором активации остеокластов (ОК). Другой, обозначаемый, как рецептор-активатор ядерного фактора каппа-В (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. OPG, связывая RANKL, предотвращает активизирующее влияние последнего на RANK ОК, что снижает как остеокластогенез, так и активность ОК [5, 6].

В ряде исследований было показано, что экспрессия RANKL и остеолит индуцируются теми же факторами, что и кальцификация гладкомышечных клеток в средней оболочке артерий. Механизм, посредством которого изменение

Таблица 1

Клиническая характеристика исследуемых групп			
Параметр/группа	Пациенты с СД и медиакальцинозом артерий нижних конечностей (1 группа)	Пациенты с СД и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей (2 группа)	Контроль
Число, (n)	20	29	30
Возраст, М (min-max)	58,3 (40–82)	61 (34–79)	–
Пол, (м/ж)	9/11	13/16	8/22
СД1/СД2	4/16	3/26	–
Длительность СД, М (min-max)	18,7 5–42	13,6 3–29	–

скорости кровотока индуцирует патологические процессы в костных клетках, неизвестен, однако, некоторые работы демонстрируют, что система OPG/RANKL играет важную роль в процессе как кальцификации артерий, так и развитии локальной остеопении [7, 8, 9].

В этой связи представляет интерес изучение особенностей данного многофакторного взаимодействия при синдроме диабетической стопы, где дистальная полинейропатия, медиакальциноз и облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей носят комплексный и прогрессирующий характер.

Материалы и методы исследования

В отделении терапевтических и хирургических методов лечения диабетической стопы ФГУ ЭНЦ Росмедтехнологий было обследовано 79 человек. На основании результатов проведенного обследования все пациенты были разделены на следующие группы: 20 пациентов с выраженной ДН и медиакальцинозом артерий нижних конечностей (группа 1), 29 пациентов с СД и клиническими проявлениями облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (группа 2). Группу контроля составили 30 человек без нарушения углеводного обмена (3 группа).

Клиническая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Контрольная группа включалась в исследование на этапе определения биохимических маркеров костного метаболизма и липидного обмена.

С целью оценки компенсации углеводного обмена пациентам с СД определялся уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) (анализатор «Diastat» «BioRad», США).

Липидный обмен (ТГ, общего ХС, ЛПВП, ЛПНП) изучался на автоматическом биохимическом анализаторе «Spectrum» («Abbott Diagnostics», США) по стандартным методикам с использованием реагентов производителя.

Присутствие и степень выраженности ДН оценивали с помощью определения различных видов чувствительности. Вибрационную чувствительность измеряли градуированным камертоном (Kircher&Wilhelm, Германия) в стандартных точках (медиальная лодыжка и основание 1-го пальца). Тактильную чувствительность определяли с помощью 10-ти граммового монофиламента (North Coast Medical, Inc., США) в стандартных точках. Температурную чувствительность оценивали с помощью стандартного цилиндра Типтерм (Neue Medizintechnik GmbH, Германия).

В качестве маркеров костеобразования в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли уровень активности костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ), OPG и RANKL, наборами Alkphase-B, Metra biosystems, США; Osteoprotegerin, Biomedica, Австрия; sRANKL, Biomedica, Австрия соответственно.

Для оценки состояния костных структур нижних конечностей и выявления медиакальциноза артерий нижних конечностей, пациентам с СД проводилась цифровая рентгенография пораженных суставов в прямой и боковой проекциях на аппарате «Axiom Iconos R 200» (Siemens, Германия).

Ультразвуковое дуплексное сканирование артерий нижних конечностей проводилось на аппарате «Sonos-5500» (Agilent, США). Исследование было выполнено в отделении кардиологии ФГУ ЭНЦ Росмедтехнологий. Задачей ультразвуковой диагностики являлось определение проходимости артерий нижних конечностей. Оценивалась толщина комплекса интима-медиа (КИМ) дистальной части (10–20 мм) правой и левой общих бедренных артерий (ОБА) в продольном сечении.

В целях изучения состояния МПКТ у пациентов с медиакальцинозом артерий нижних конечностей, проводилось денситометрическое исследование с помощью двойной энергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат «Expert 1188», Lunar, США). Определялась МПКТ в поясничном сегменте L1-L4, проксимальном отделе бедренной кости, с избирательной оценкой костной плотности в отдельных зонах (шейка бедра, область Варда, L1-L4 и большой вертел). Полученные

Таблица 2

Результаты биохимического исследования крови у исследуемых групп			
Параметр	1-я группа	2-я группа	Контроль
HbA _{1c} %, М (min-max)	8,8 (5,2–12)	9,4 (6,8–13,3)	–
Общ. холестерин, ммоль/л, М±SD	5,01±1,15	5,46±1,04	4,37±0,52
ЛПНП, ммоль/л, М±SD	3,71±1,41	3,04±1,03	2,46±0,57
ЛПВП, ммоль/л, М±SD	1,45±0,8	1,45±0,33	1,49±0,26
КЩФ, Ед/л, М±SD	190,07±76,2	200,60±24,91	150,8±23,5
OPG, пмоль/мл, М±SD	5,09±2,61	5,16±1,63	2,9±0,87
RANKL, пмоль/мл, М±SD	0,13±0,09	0,10±0,08	0,13±0,08

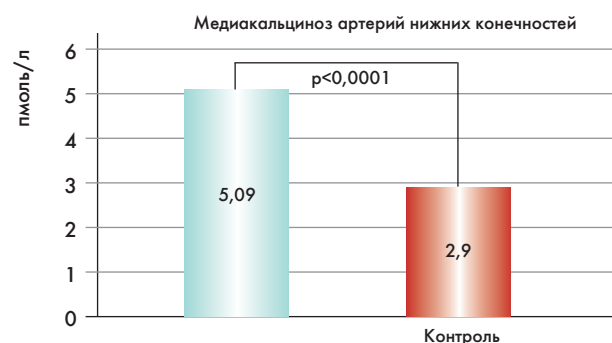
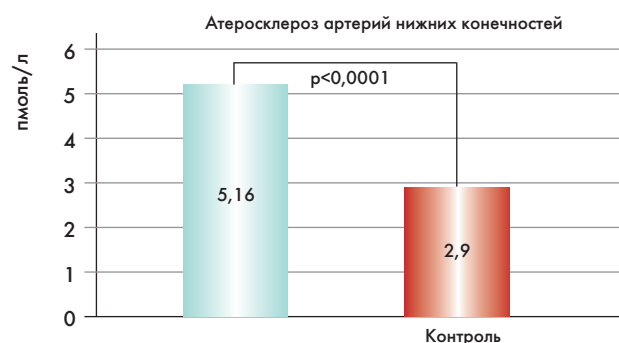


Рис. 2. Уровень OPG у пациентов с заболеваниями периферических артерий по сравнению с группой контроля

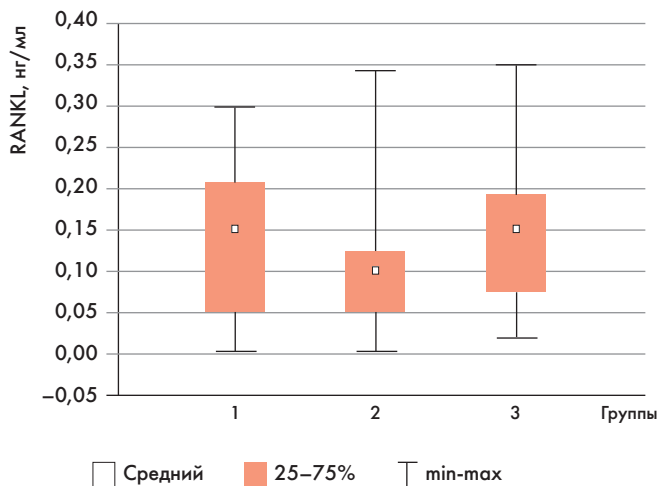


Рис. 3. Уровень RANKL в исследуемых группах

значения выражались в г/см². Изменения МПКТ оценивались по Т-критерию (сравнение с пиковыми значениями в возрасте до 30 лет) и Z-критерию (сравнение со средними нормативами для данного возраста и пола). Для характеристики нарушений МПКТ использовались рекомендации ВОЗ, согласно которым снижение МПКТ по Т-критерию более чем на 1 SD рассматривается как остеопения, а более 2,5 SD – как остеопороз.

Анализ клинических данных проводился с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения для ПК: Microsoft Excel и Statistica 6.0. Количественные данные в группах проверялись на нормальность распределения с помощью теста Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's W-test). Для проверки статистических гипотез были использованы следующие непараметрические критерии: критерий хи-квадрат Пирсона (Pearson chi-square), точный критерий Фишера (Fisher exact p), критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney) и коэффициент ранговой корреляции Спирмена (Spearman). Выявление меры линейной связи между параметрами проводилось с помощью коэффициента корреляции Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для всех критериев и тестов критический уровень значимости (если не оговорено иное) принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Все больные имели выраженную ДН, проявляющуюся нарушениями вибрационной, тактильной и температурной чувствительности. Наиболее значимое снижение вибрационной чувствительности отмечено у пациентов 1-й группы ($0,9 \pm 1,16$ баллов) в сравнении со 2-й группой ($2,17 \pm 1,33$) ($p < 0,001$); температурной, во 2-й группе (79,5%) по сравнению с 1-й группой (30%) ($p < 0,05$); тактильной – в 1-й группе (55%) в сравнении со 2-й группой (44,8%). Таким образом, была отмечена большая степень неврологического дефицита у пациентов с медиакальцинозом артерий нижних конечностей.

У всех групп пациентов был выявлен повышенный уровень HbA_{1c} , что свидетельствовало о декомпенсации углеводного обмена на момент обследования. Корреляции между ХС, ТГ, ЛПНП, ЛПВП и HbA_{1c} получено не было. Результаты биохимического исследования крови представлены в табл. 2.

Выявлено достоверное повышение OPG у пациентов как 1-й, так и 2-й групп по сравнению с группой контроля ($p < 0,0001$) (рис. 2). Результаты проведенных исследований

позволяют предположить, что концентрация OPG в сыворотке крови выше у лиц, имеющих СД и кальцификацию различных слоев сосудистой стенки [10, 11]. Полученные данные подтверждают это.

Достоверных различий по уровню RANKL в сыворотке крови исследуемых групп получено не было (рис. 3).

Наиболее высокие значения OPG отмечены у пациентов с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей. Содержание OPG обратно коррелировало с RANKL ($r = -0,68$, $p < 0,001$) у пациентов 1-й группы. По-видимому, это связано с дисбалансом в системе OPG/RANKL, проявляющимся избыточной экспрессией OPG и, как следствие, пролиферацией и кальцификацией меди артерий нижних конечностей, что подтверждается данными литературы [12, 13].

Повышение уровня общего холестерина (ХС) отмечалось у пациентов с СД по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Уровень триглицеридов (ТГ) у исследуемых групп был в пределах нормальных значений. Не было выявлено достоверных различий между группами по уровню ЛПНП и ЛПВП, однако, уровень ЛПНП был несколько выше у пациентов 1-й и 2-й групп по сравнению с группой контроля. Выявлена прямая корреляционная связь значений ХС ($r = 0,3$; $p < 0,0003$) и ТГ ($r = 0,2$; $p < 0,001$) с значениями OPG в группах больных СД. Полученные данные позволяют рассматривать дислипидемию, как фактор риска формирования медиакальциноза и кальцификации внутренней оболочки артерий нижних конечностей.

При определении значений показателя синтеза костной ткани – костного изофермента щелочной фосфатазы в сыворотке крови, отмечено повышение этого показателя в группе пациентов с медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, по сравнению с группой контроля ($p < 0,0001$). Это объясняется высокой скоростью костного метаболизма со значительным усилением синтетической функции остеобластов в ответ на резорбцию и, вероятно, последующей кальцификацией интимы и меди артерий. Это подтверждается обнаруженной положительной корреляционной связью между значениями КЩФ и значениями OPG ($r = 0,2$, $p < 0,01$) и RANKL ($r = 0,21$, $p < 0,01$). Полученные результаты позволяют судить о роли системы OPG/RANKL в развитии кальцификации меди и интимы при СД и требуют дальнейшего изучения данного взаимодействия.

Выявлена обратная корреляционная зависимость между значениями МПКТ и уровнем OPG в группе пациентов с медиакальцинозом артерий нижних конечностей ($r = -0,61$; $p < 0,002$), что подтверждает взаимосвязь процессов кальцификации и остеопении у данных больных.

При проведении ультразвукового измерения толщины КИМ у исследуемых групп, не было получено достоверных различий между правой и левой ОБА. Этот показатель составил соответственно в 1-й группе – $1,05 \pm 0,19$ мм и $1,07 \pm 0,14$ мм ($p < 0,95$), во 2-й группе – $0,87 \pm 0,19$ мм и $0,86 \pm 0,21$ мм ($p < 0,6$) мм и в группе контроля – $0,57 \pm 0,18$ мм и $0,59 \pm 0,17$ мм ($p < 0,5$). При сравнении групп между собой наиболее утолщенный КИМ был у пациентов с медиакальцинозом артерий нижних конечностей ($p < 0,002$), при сравнении с группой контроля ($p < 0,0001$). Тем не менее, связи между значениями толщины КИМ и значениями OPG и RANKL, получено не было. По всей видимости это связано с определением OPG и RANKL в сыворотке крови, а по данным литературы экспрессия OPG была обнаружена непосредственно в интима и меди крупных сосудов, вызывающая пролиферацию и кальцификацию гладкомышечных клеток сосудистой стенки. Это требует дальнейшего изучения данного взаимодействия.

Выводы

Уровень OPG в сыворотке крови достоверно выше у больных сахарным диабетом, имеющих медиакальциноз или облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей, по сравнению с лицами без нарушения углеводного обмена.

Медиакальциноз и облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей характеризуются значительным повыше-

нием OPG в сыворотке крови, что является одним из основных факторов кальцификации меди при медиакальцинозе и интимы при атеросклерозе артерий нижних конечностей.

У больных с медиакальцинозом и облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей отмечена корреляция между уровнем холестерина, триглицеридов и OPG, что позволяет рассматривать дислипидемию, как фактор риска формирования медиакальциноза и кальцификации внутренней оболочки артерий нижних конечностей.

Литература

1. Jeffcoate W. / Vascular calcification and osteolysis in diabetic neuropathy – is RANK-L the missing link? // *Diabetologia* 2004. 47:1488–1492.
2. 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. / Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. // *Cell* 89: 309–319.
3. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S. et al. / Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits the osteoclastogenesis // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997 V.234 P. 137–142.
4. 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. / Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. // 1998, *Endocrinology* 39:1329–1337.
5. Беневоленская Л.И. Руководство по остеопорозу. // М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. – с.826.
6. Шварц Г.Я. 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 остеопатии* № 2, 2003. – с. 21–22.
7. Abedin M., Tintut Y., Demer L. / Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. // *Atherosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2004; 24; 1164–1170.
8. Hofbauer L., Shoppert M. / Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? // *The Lancet*. Vol.358, July 28, 2001.
9. Min H., Morony S., Sarosi I., et. al. / Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. // *J. Exp Med* 2000; 192: 463–74.
10. Browner W.S., Lui L.Y., Cummings S.R. / Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. // *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 631–37.
11. Schoppert M., Sattler ANM, Schaefer J.R., Herzum M., Maisch B., Hofbauer L.C. / Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. // *J. Clin Endocrinol. Metabol.* 2003, 88: 1024–1028.
12. Hofbauer L.C., Shui C., Riggs B.L., et al. / Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cell. // *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:334–39.
13. Malyankar U.M., Scatena M., Suchland K.L., Yun T.J., Clarc E.A., Giachecelli C.M. / Osteoprotegerin is an β -induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. // *J. Biol.Chem* 2000; 275: 20959–62.