

УДК 547.412.4:616 – 099:636.028

## ПЛАЗМЕННАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКОВ РЕГУЛЯТОРОВ ОСТЕОКЛАСТОГЕНЕЗА И ОСТЕОБЛАСТОГЕНЕЗА ПРИ ПОДОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЕТАНОМ

**Камилов Ф.Х., Фаршатова Е.Р., Еникеев Д.А., Ганеев Т.И.**

*ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Уфа, e-mail: bro-raops@yandex.ru*

Эксперименты проведены на 20 половозрелых крысах-самцах массой 180–200 г, разделенных на 2 группы: контрольную и подопытную. Крысам подопытной группы ежедневно в течение двух месяцев внутрижелудочно вводили дихлорэтан в оливковом масле из расчета 0,84 мг/кг массы в суммарной дозе 0,1 ЛД<sub>50</sub>, животные контрольной группы получали адекватный объем оливкового масла. В плазме крови методом иммуноферментного анализа исследовали содержание регуляторов остеокластогенеза – растворимого RANKL и остеопротегерина, а также ингибитора Wnt $\beta$  – catenin сигнального пути остеобластогенеза склеростина. При подострой интоксикации дихлорэтаном в суммарной дозе 0,1 ЛД<sub>50</sub> в плазме крови наблюдается повышение содержания растворимого RANKL и склеростина, снижение остеопротегерина, характеризующая усиление в костной ткани остеокластогенеза и подавление дифференцировки клеток остеобластного ряда.

**Ключевые слова:** дихлорэтан, интоксикация, RANKL, остеопротегерин, склеростин

## PLASMA CONCENTRATIONS OF PROTEINS AND REGULATORS OF OSTEOCLASTOGENESIS AND OSTEOBLASTOGENESIS SUBACUTE INTOXICATION DICHLOROETHANE

**Kamilov F.H., Farshatova E.R., Enikeev D.A., Ganeev T.I.**

*Medical University «Bashkir State Medical University» Ministry of Health  
of the Russian Federation, Ufa, e-mail: bro-raops@yandex.ru*

Bashkirian State Medical University, Ufa, Ufa, e-mail: bro-raops@yandex.ru Experiments were conducted on 20 adult rats – male weighing 180–200 g were divided into 2 groups: control and experimental. The rats of the experimental group on a daily basis for two months were administered intragastrically dichloroethane in olive oil based 0,84 mg / kg at a total dose of 0,1 LD<sub>50</sub> animals of the control group received an adequate amount of olive oil. The blood plasma was investigated by enzyme immunoassay content controls osteoclastogenesis – soluble RANKL and osteoprotegerin, and inhibitor Wnt $\beta$  – catenin signaling pathway osteoblastogenesis sklerostina. In subacute toxicity dichloroethane at a total dose of 0.1 LD<sub>50</sub> in plasma is elevated levels of soluble RANKL and sklerostina, decrease osteoprotegerin, characterizing the gain in bone osteoclastogenesis and the suppression of a number of osteoblastic cell differentiation.

**Keywords:** dichloroethane, intoxication, RANKL, osteoprotegerin, sklerostin

Костная ткань характеризуется активным обменом веществ и протекающей на протяжении всей жизни перестройкой – ремоделированием. Ремоделирование позволяет ей выполнять функцию опорной ткани, постоянно адаптирующейся к изменяющимся воздействиям внешней и внутренней среды, максимально соответствуя существующим нагрузкам, а также роль «депо» значительной группы минеральных соединений. Обмен костной ткани регулируется многоуровневой системой, взаимосвязь и дублирование которых значительно повышает их надежность. При этом синтезируемые в костном мозге и костных клетках факторы роста, цитокины и молекулы адгезии обеспечивают взаимодействие между клетками, клетками и матриксом костной ткани, опосредуют эффекты механических сигналов и эффекты системных регуляторных факторов, включая экспрессию генов, активирующих как остеокластогенез и резорбцию, так и остеобластогенез и костеобразование, а также контролирующих эти процессы механизмами обратной связи [2, 4, 8].

В механизмах реализации и контроля эффектов факторов регуляции ремоделирования особую роль играет система RANK – RANKL – остеопротегерин [1, 7, 11]. RANKL (лиганд рецептора ядерного фактора каппа В), продуцируемый остеобластами / стромальными клетками, взаимодействует с рецептором RANK, экспрессированном на предшественниках остеокластов, и запускает каскад внутриклеточных механизмов, стимулирующих их созревание, дифференцировку и активность, а также ингибирует апоптоз зрелых остеокластов [7, 11].

Остеопротегерин (OPG) – растворимый «ложный» рецептор для RANKL, член суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли альфа, связывает RANKL, являясь «ловушкой» для этого лиганда. Взаимодействие RANKL с OPG ингибирует пролиферацию остеокластов, их дифференцировку, что в конечном итоге снижает резорбцию кости [10]. Общее «конвергентное» соотношение RANKL / OPG, таким образом, становится основной детерминантой костной деструкции.

Важнейшими регуляторами остеобластогенеза являются секреторные белки семейства Wnt: суперсемейство, трансформирующее рост фактора  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ , активины, ингибины; факторы роста фибробластов -2,-9; инсулиноподобный фактор роста 1; костные морфогенетические белки [4]. Склеростин ингибирует каноническую сигнальную систему Wnt/ $\beta$ -catenin, необходимую для стимуляции остеобластогенеза и функции остеобластов [1, 3]. В постнатальном периоде склеростин вырабатывается только остеоцитами и минерализованными гипертрофированными хондроцитами. Он связывается с рецептором липопротеинов низкой плотности 5 (LRP 5), являющимся вместе с корцептором LRP 6, основным мембраносвязанным кофактором Wnt/ $\beta$ -catenin сигнального пути [12]. Таким образом, склеростин выполняет роль негативного регулятора остеобластогенеза.

Ранее проведенные исследования показали, что у работников химического предприятия, имеющих производственный контакт с низкомолекулярными хлорированными ациклическими углеводородами (дихлорэтан, хлорпропан, хлорпропен, хлорвинил, эпихлоргидрин и др.), обнаруживается высокая частота снижения костной прочности [6, 9]. Подострая интоксикация низкими суммарными дозами дихлорэтана (0,05 ЛД<sub>50</sub> и 0,1ЛД<sub>50</sub>) приводит в костной ткани экспериментальных животных к усилению ремоделирования с доминированием процессов резорбции, повышению катаболизма коллагена на фоне снижения его биосинтеза [5].

### Цель работы

Оценить в плазме крови уровни sRANKL и OPG и содержание экстрацеллюлярного ингибитора Wnt/ $\beta$ -catenin сигнального пути – склеростина при подострой интоксикации дихлорэтаном.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 20 половозрелых крысах-самцах массой 180–200 г. Животные были разделены на 2 группы: контрольную и подопытную. Крысам подопытной группы ежедневно внутривенно вводили дихлорэтан в оливковом масле из рас-

чета 0,84 мг/кг массы, животные контрольной группы получали адекватный объем оливкового масла. Введение дихлорэтана осуществляли в течение двух месяцев, суммарная доза поллютанта составила 0,1 ЛД<sub>50</sub>.

У животных в плазме крови с использованием коммерческих тест-наборов методом иммуноферментного анализа определяли содержание растворимого RANKL (реагенты «Free RANKL», остеопротегерина («Osteoprotegerin») и склеростина («Sclerostin») фирмы Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программы Statistica 6,0 (Stat. Soft).

### Результаты исследования и их обсуждение

Подострая интоксикация дихлорэтаном экспериментальных животных приводила в плазме крови к статистически значимому повышению содержания растворимого RANKL и снижению OPG (таблица).

В результате значительно увеличивается соотношение RANKL/ OPG, характеризующая активацию процессов дифференцировки и созревания остеокластов. В контрольной группе животных этот коэффициент составил  $1,46 \pm 0,22$  ( $\pm s$ ), у подопытной группы –  $2,84 \pm 0,32$  ( $p < 0,02$ ). Угнетением OPG характеризуются многие состояния, протекающие с доминированием резорбции над формированием костной ткани: гиперпаратиреозидозы, избыточная секреция простагландина E<sub>2</sub> и провоспалительных интерлейкинов, длительная терапия глюкокортикоидами, гипострогенемия и др. [1, 6, 8, 9].

Содержание склеростина у подопытных крыс повышалось ( $p = 0,0206$ ), отражая усиление его секреции остеоцитами и косвенно отражая подавление остеобластогенеза на фоне активации резорбционных процессов. Экспрессия склеростина повышается у женщин в постменопаузе, при глюкокортикоидной терапии, снижается под действием эстрогенов, при прерывистом введении терипаратида (ПТГ 1–34) [2, 10]. Важная роль этого цитокина как одного из регуляторов ремоделирования с усилением остеобластогенеза показана в экспериментальных и клинических условиях с использованием моноклональных антител к склеростину [2].

Уровень регуляторных цитокинов в плазме крови при интоксикации дихлорэтаном, Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]

Цитокины, пмоль/л	Контрольная группа, n = 10	Подопытная группа (дихлорэтан 0,1ЛД <sub>50</sub> ), n = 10	PU
s RANKL	0,60 [0,12; 1,29]	0,74 [0,73; 0,76]	0,0405
OPG	0,41 [0,40; 0,43]	0,26 [0,11; 0,34]	0,0029
Склеростин	12,3 [12,2; 12,5]	18,5 [12,9; 18,7]	0,0206

Примечание. PU-критерий Манна-Уитни.

**Выводы**

При подострой интоксикации дихлорэтаном в суммарной дозе 0,1 ЛД<sub>50</sub> в плазме крови наблюдается повышение содержания растворимого RANKL и склеростина, снижение остеопротегерина, характеризующее усиление в костной ткани остеокластогенеза и подавление дифференцировки клеток остеобластного ряда.

**Список литературы**

1. Белая Е.Ж., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В. и др. Сывороточные концентрации белков регуляторов остеобластогенеза и остеокластогенеза у пациентов с эндогенным гиперпаратиреозом // Остеопороз и остеопатии. – 2012. – № 2. – С. 3–8.
2. Беневоленская Л.И., Насонов Е.Л. Патогенез остеопороза / В кн. Руководство по остеопорозу / Под ред. Л.И. Беневоленской. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – С. 77–104.
3. Дыдыкина С.И., Веткова Е.С. Склеростин и его роль в регуляции метаболизма кости // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 3. – С. 296–301.
4. Захаров Ю.М., Макарова Э.Б. Регуляция остеогенной дифференциации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга // Росс. физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 4. – С. 417–432.
5. Камиллов Ф.Х., Ганеев Т.И., Фаршатов Е.Р. и др. Ремоделирование костной ткани при действии хлорпроизводных низкомолекулярных алифатических углеводов // Мед. вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 45–48.
6. Камиллов Ф.Х., Меньшикова И.А., Нурлыгаянов Р.З., Рамазанова Л.М. Состояние минеральной плотности костной ткани у рабочих химического производства // Мед. вестник Башкортостана. – 2007. – № 2. – С. 78–82.
7. Кушлинский Н.Е., Тимофеев Ю.А., Герштейн Е.С. Система RANK / RANKL / OPG при метастазах и первичных новообразованиях костей // Молек. медицина. – 2013. – № 6. – С. 3–10.
8. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) – т. 2. / Под ред. С.П. Миронова. – М.: Изд-во «Известия», 2010. – С. 314–362.
9. Рамазанова Л.М., Меньшикова И.А., Камиллов Ф.Х. Нарушения минеральной плотности костной ткани у мужчин – работников химического производства // Вестник Оренбургского государственного университета – 2008. – № 9. – С. 199–203.
10. Юренева С.В. Остеопротегерин и его лиганды в регуляции костной резорбции: экспериментальные и клинические аспекты применения при эстрогендефицитных состояниях // Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – № 1. – С. 107–110.
11. Sagalovsky S., Schonert M. RANKL-RANK-OPG system and bone remodeling: a new approach on the treatment of osteoporosis // Clin. Explt. Pathol. – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 146–153.
12. Von Bezooijen R.L., ten Dijke P., Papapoulos S.E., Lowil C.W. SOST / sclerostin, an osteocyte derived negative regulator on bone formation // Cytokine Growth factor Rev. – 2005. – Vol. 16. – P. 319–327.

**References**

1. Belaja E.Zh., Rozhinskaja L.Ja., Dragunova N.V. i dr. Syvorotochnye koncentracii belkov reguljatorov osteoblastogeneza i osteoklastogeneza u pacientov s jendogennym giperkorticismom // Osteoporoz i osteopatii. 2012. no. 2. pp. 3–8.
2. Benevolenskaja L.I., Nasonov E.L. Patogenez osteoporoz / V kn. Rukovodstvo po osteoporozu / Pod red. L.I. Benevolenskoj. M.: BINOM. Laboratorija znanij, 2003. pp. 77–104.
3. Dydykina S.I., Vetkova E.S. Sklerostin i ego rol v reguljácii metabolizma kosti // Nauchno-prakticheskaja revmatologija. 2013. T. 51, no. 3. pp. 296–301.
4. Zaharov Ju.M., Makarova Je.B. Reguljacija osteogenoj differenciacii mezenhimalnyh stvolovyh kletok kostnogo mozga // Ross. fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova. 2013. T. 99, no. 4. pp. 417–432.
5. Kamilov F.H., Ganeev T.I., Farshatova E.R. i dr. Remodelirovanie kostnoj tkani pri dejstvii hlorproduzvodnyh nizkomolekuljarnyh alifaticeskikh uglevodorodov // Med. vestnik Bashkortostana. 2011. T. 6, no. 2. pp. 45–48.
6. Kamilov F.H., Menshikova I.A., Nurlygajjanov R.Z., Ramazanova L.M. Sostojanie mineralnoj plotnosti kostnoj tkani u rabochih himicheskogo proizvodstva // Med. vestnik Bashkortostana. 2007. no. 2. pp. 78–82.
7. Kushlinskij N.E., Timofeev Ju.A., Gershtejn E.S. Sistema RANK / RANKL / OPG pri metastazah i pervichnyh novoobrazovanij kostej // Molek. medicina. 2013. no. 6. pp. 3–10.
8. Omeljanenko N.P., Sluckij L.I. Soedinitelnaja tkan (gistofiziologija i biohimija) t. 2. / Pod red. S.P. Mironova. M.: Izd-vo «Izvestija», 2010. pp. 314–362.
9. Ramazanova L.M., Menshikova I.A., Kamilov F.H. Narusheniya mineralnoj plotnosti kostnoj tkani u muzhchin rabotnikov himicheskogo proizvodstva // Vestnik Orenburgskogo gosuniversiteta 2008. no. 9. pp. 199–203.
10. Jureneva S.V. Osteoprotegerin i ego ligandy v reguljácii kostnoj rezorbicii: jeksperimentalnye i klinicheskie aspekty primeneniya pri jestrogendeficitnyh sostojanijah // Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. 2004. no. 1. pp. 107–110.
11. Sagalovsky S., Schonert M. RANKL-RANK-OPG system and bone remodeling: a new approach on the treatment of osteoporosis // Clin. Explt. Pathol. 2011. Vol. 10, no. 2. pp. 146–153.
12. Von Bezooijen R.L., ten Dijke P., Papapoulos S.E., Lowil C.W. SOST / sclerostin, an osteocyte derived negative regulator on bone formation // Cytokine Growth factor Rev. 2005. Vol. 16. pp. 319–327.

**Рецензенты:**

Шакиров Д.Ф., д.м.н., профессор кафедры общей гигиены с экологией с курсом гигиенических дисциплин МПФ, ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа; Еникеев Р.И., д.м.н., профессор, заведующий травматолого-ортопедическим отделением ГБУЗ «Республиканский клинический госпиталь ветеранов войн», г. Уфа.