

СЫВОРОТОЧНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ РЕГУЛЯТОРОВ ОСТЕОБЛАСТОГЕНЕЗА И ОСТЕОКЛАСТОГЕНЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ЭНДОГЕННЫМ ГИПЕРКОРТИЦИЗМОМ

Ж.Е. БЕЛАЯ^{1*}, Л.Я. РОЖИНСКАЯ², Н.В. ДРАГУНОВА³, А.Г. СОЛОДОВНИКОВ⁴, А.В. ИЛЬИН⁵, Л.К. ДЗЕРАНОВА⁶, Г.А. МЕЛЬНИЧЕНКО⁷, И.И. ДЕДОВ⁸

¹ к.м.н., старший научный сотрудник отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

² д.м.н., профессор, зав. отделением нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

³ аспирант отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

⁴ к.м.н., ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» МЗ РФ

⁵ зав. лабораторией биохимии и гормонального анализа ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

⁶ д.м.н., главный научный сотрудник отделения нейроэндокринологии и остеопатий ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

⁷ д.м.н., профессор, академик РАМН, директор Института клинической эндокринологии ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

⁸ д.м.н., профессор, академик РАН и РАМН, директор ФГБУ ЭНЦ МЗ РФ

Цель. Изучить содержание экстрацеллюлярных ингибиторов Wnt/b-catenin сигнального пути (склеростин, диккопф 1 (Дкк1), связывающий белок фризельда 1 (сФРЗ 1)), а также уровней лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа бета (РАНКЛ) и остеопротегерина (ОПГ) в сыворотке крови у пациентов с активным эндогенным гиперкортицизмом в сравнении со здоровыми лицами.

Материалы и методы. В исследование было включено 40 пациентов с манифестным эндогенным гиперкортицизмом (ЭГ), подтвержденным лабораторно, и 40 человек контрольной группы, подобранных по полу, возрасту и индексу массы тела. Участники исследования сдавали анализ крови натощак между 8-10 утра для определения уровней РАНКЛ, ОПГ, склеростина, Дкк1, сФРЗ1 и маркеров костного обмена. Образцы сывороток были заморожены и одновременно исследованы иммуноферментным методом с использованием соответствующих коммерческих наборов. Свободный кортизол в суточной моче определялся методом ИХЛА на анализаторе Vitros ECi с экстракцией диэтиловым эфиром. Маркеры костного обмена исследовались на автоматическом анализаторе электрохемилюминесцентным методом. Все пациенты были опрошены по поводу низкотравматичных переломов за период болезни, выполнена боковая рентгенография позвоночника в грудном и поясничном отделах (Axiom Icons R200 «Siemens»).

Результаты. У пациентов с ЭГ (М_е возраста 30 лет (26-40)) выявлен повышенный уровень кортизола в суточной моче — 2575 (1184-4228) нмоль/л. Значительное подавление остеокальцина (ОК) у пациентов с ЭГ сочеталось с нормальным уровнем маркера костного разрушения — С-концевого телопептида коллагена I типа (СТх) по сравнению со здоровым контролем. Корреляционная зависимость ОК и СТх, существующая среди здоровых людей ($\rho=0,724$ ($p<0,001$)) ослаблялась среди пациентов с ЭГ ($\rho=0,285$ ($p=0,083$)). Уровень свободного кортизола в моче у пациентов с ЭГ коррелировал с уровнем остеокальцина $\rho=-0,464$ $p=0,003$, но не с СТх $\rho=0,245$ ($p=0,132$). Показатели склеростина у пациентов с ЭГ были выше по сравнению со здоровым контролем $p=0,032$. Уровень склеростина выше 662 нг/мл существенно чаще встречался среди больных гиперкортицизмом по сравнению со здоровыми людьми (ОШ=4,19 95% ДИ 1,44-12,22), $p=0,006$. Уровни Дкк 1 и сФРЗ1 не отличались. У пациентов с ЭГ наблюдалось снижение РАНКЛ (0,083 (0,075-0,093) пмоль/л по сравнению со здоровым контролем 0,106 (0,089-0,131) пмоль/л $p<0,001$. Более выраженное снижение РАНКЛ и статистически значимое повышение ОПГ были выявлены у пациентов с ЭГ и низкотравматичными переломами ($n=19$) по сравнению с пациентами без низкотравматичных переломов ($n=21$).

Выводы. Уровень склеростина отличается у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, главным образом из-за отсутствия низких значений белка. Среди других антагонистов Wnt/b-catenin сигнального пути (Дкк1, сФРЗ1), а также сигнального пути РАНКЛ/ОПГ, склеростин представляет наиболее многообещающей молекулой для терапевтического воздействия у пациентов с глюкокортикоидным остеопорозом, в частности при эндогенном гиперкортицизме.

Ключевые слова. Склеростин, диккопф 1, связывающий белок фризельда 1, эндогенный гиперкортицизм, глюкокортикоид-индуцированный остеопороз.



Глюкокортикоидный остеопороз (ГКО) — наиболее распространенная и тяжелая форма вторичного остеопороза [1]. Воздействие глюкокортикоидов (ГК) приводит к значительному увеличению риска низкотравматичных переломов [1,2]. Среди пациентов с эндогенным гиперкортицизмом переломы позвонков по различным данным регистрируются в 40-76% случаев [3, 4].

Патогенетически ГКО отличается от постменопаузального остеопороза (ПМО). При ПМО наблюдается ускорение костного обмена с повышением в сыворотке крови как маркеров костеобразования, так и маркеров костного разрушения на 50-150% [5,6]. Супрафизиологические концентрации ГК, напротив, приводят к снижению маркеров костеобразования при экзогенном [7,8] и эндогенном гиперкортицизме [9,10]. Результаты исследований маркеров костного разрушения при воздействии ГК противоречивы. Некоторые ис-

следователи выявили повышение С-терминального телопептида коллагена I типа (СТх) [11], в других работах уровень СТх не отличался от группы контроля [10].

Подавление остеобластогенеза, наиболее вероятно, реализуется через канонический винглес-бета-катенин (Wnt/b-catenin) сигнальный путь, который обозначен ключевым регулятором костной массы из-за его влияния на дифференцировку и созревание остеобластов [12-16]. Экстрацеллюлярные антагонисты Wnt/b-catenin сигнального пути предупреждают дифференцировку мезенхимальной стволовой клетки в остеобласт путем связывания wnt белков активаторов (секретируемые белки, связанные с фризельдом (сФРЗ), Wnt ингибирующий фактор 1 (ВИФ-1)) или образуя комплекс с одним из компонентов wnt-рецептора (Диккопф 1 (Дкк 1) и склеростин) [17]. При этом остеобласты на разных

* jannabelaya@gmail.com

этапах своей дифференцировки экспрессируют различное соотношение лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа бета (РАНКЛ) и остеопротегерина (ОПГ), регулируя таким образом активность остеокластов. Существует мнение, что ГК увеличивают экспрессию РАНКЛ и изменяют соотношение РАНКЛ к ОПГ, что приводит к увеличению остеокластогенеза [18, 19].

Воздействие на ключевые молекулы этих сигнальных путей может быть серьезным прорывом в разработке терапии ГКО. Вместе с тем современное понимание патогенеза ГКО основано на данных, полученных на культурах клеток или животных моделях, что имеет свои ограничения [20]. Кроме того, аутоиммунные заболевания влияют на активность остеокластов из-за их макрофагального происхождения. [21]. Заболевания, по поводу которых были назначены синтетические ГК, могут сами по себе влиять на костную ткань [22]. Например, при патологии кишечника основную роль играет нарушение всасывания и, следовательно, дефицит кальция и витамина D [23], в то время как при хронических obstructивных болезнях лёгких гипоксия, ацидоз и курение выступают в качестве дополнительных негативных факторов помимо ГК [24].

У пациентов с эндогенным гиперкортицизмом воздействие глюкокортикоидов на костную ткань может быть изучено независимо от этиологии заболевания, по поводу которого были назначены ГК, дозы и типа препарата, а также приверженности пациента к лечению. Кроме того, эндогенным гиперкортицизмом обычно болеют сравнительно молодые и в остальном здоровые люди, что позволяет изучить изолированное влияние ГК у человека.

Цель настоящего исследования: оценить содержание экстрацеллюлярных ингибиторов Wnt/b-catenin сигнального пути (склеростин, Дкк1, сФРЗ 1), а также уровней РАНКЛ и ОПГ в сыворотке крови у пациентов с активным эндогенным гиперкортицизмом в сравнении со здоровыми лицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 40 пациентов с яркой клиникой гиперкортицизма и гормонально-биохимическими показателями, характерными для ЭГ. Для подтверждения гиперкортицизма у пациентов исследовали суточный кортизол в моче (референтные значения 60-413 нмоль/л), свободный кортизол в слюне в 23:00 (референтный интервал 0,5-9,4 нмоль/л) [25]), уровень кортизола в сыворотке крови, собранной вечером (референтный интервал 46-270 нмоль/л), а также уровень кортизола в крови после малой пробы с дексаметазоном (точка разделения 50 нмоль/л) [26].

Причиной эндогенного гиперкортицизма в одном случае был синдром Иценко-Кушинга, еще одна пациентка впоследствии была успешно прооперирована по поводу карциноидной опухоли аппендикса. В двух случаях источник секреции АКТГ не был найден, и пациентам по жизненным показаниям была проведена двухсторонняя адреналэктомия. Болезнь Иценко-Кушинга была подтверждена в 36 случаях. Трансфеноидальная аденомэктомия позволила добиться ремиссии в 31 случае. Повторная операция была эффективна еще в трех случаях.

Группу контроля составили 40 здоровых людей, подобранных по возрасту, полу и индексу массы тела. Здоровые добровольцы были осмотрены эндокринологом, не имели клинических признаков гиперкортицизма.

Критерии исключения: беременность, применение глюкокортикоидов, злоупотребление алкоголем, острые инфекции, обострение хронических заболеваний, тяжелые, угрожающие жизни состояния (в частности, почечная и печеночная недостаточность, инфаркт, инсульт), терминальные состояния, тяжелые психиатрические заболевания, пролонгированная иммобилизация (>1 недели), другие заболевания, приводящие к вторичному остеопорозу, а также длительный

прием медикаментов, оказывающих негативное влияние на костный обмен, согласно последним рекомендациям по остеопорозу Американской Ассоциации Эндокринологов, [27] и прием препаратов для лечения остеопороза.

Все пациенты с эндогенным гиперкортицизмом в активной стадии заболевания (до назначения какого-либо лечения) и контрольная группа сдали анализ крови натощак между 8-10 утра для определения маркеров костного обмена (остеокальцин (ОК) и СТх), инсулиноподобного фактора роста 1 (ИРФ-1), витамина D (25ОНD3). Одновременно были взяты образцы крови для определения РАНКЛ, ОПГ, склеростина, Дкк1, сФРЗ1. Сыворотки были отцентрифугированы сразу после забора крови, заморожены и сохранены при температуре -70°C.

Уровни склеростина, РАНКЛ, ОПГ были измерены коммерчески доступными наборами для иммуноферментного анализа (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG с rev.no. 100728, 090130, 100131 соответственно). Уровень сФРЗ1 был измерен иммуноферментным методом (Uscn Life Science Inc. E95880Hu), для измерения Дкк1 использовался иммуноферментный набор Enzo Life Sciences ADI-900-151 kit.

Маркеры костного обмена, свободный кортизол в слюне и кортизол крови исследовались в порядке поступления электрохемилуминесцентным (ЭХЛА) методом на автоматическом анализаторе Cobas e601 Roche.

ИФР1 и 25ОНD3 измерялись иммунохемилуминесцентным методом (ИХЛА) на анализаторе LIAISON.

Свободный кортизол в суточной моче исследовался методом ИХЛА на анализаторе Vitros ECi с экстракцией диэтиловым эфиром.

Все участники исследования были опрошены в отношении низкотравматичных переломов, случившихся за последние 2-3 года (в период клинических симптомов заболевания), а также болей в спине, изменения роста на 3-4 см и более. Пациентам с эндогенным гиперкортицизмом проводилось рентгенологическое исследование грудного и поясничного отделов позвоночника (Th₄—L₄) в боковой проекции на рентгеновском аппарате Axiom Icons R200 «Siemens». Перелом диагностировался при снижении высоты позвонка на 20% и более при визуальном осмотре рентгенограмм [28].

Минеральная плотность кости (МПК) у пациентов с гиперкортицизмом измерялась двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрией (DXA) Prodigy Lunar в поясничных позвонках (L₁—L₄), шейке бедра и в целом в бедре.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Все полученные данные были введены в табличный процессор, после чего был проведен разведочный анализ данных на предмет выявления ошибок ввода и пропущенных значений. Для количественных параметров был проведен тест асимметрии и эксцесса, который выявил, что большинство количественных параметров не соответствуют нормальному распределению. В связи с этим количественные параметры представлены как медианы и интерквартильный интервал, а также минимальное и максимальное значения. Качественные параметры представлены в виде абсолютного значения, доли (процентов) и двухсторонних точных биномиальных 95%-ных доверительных интервалов для доли. Для сравнения двух параметров в независимых группах мы использовали тест Манна-Уитни для количественных параметров и точный тест Фишера — для качественных параметров. Для корреляционного анализа рассчитывался непараметрический критерий ранговой корреляции по Спирману. Диагностическое отношение шансов и его 95%-ный доверительный интервал рассчитывались по стандартной методике [29].

Многофакторный анализ проводился методом множественной биномиальной логистической регрессии. Значение $p < 0,05$ рассматривалось как статистически значимое.

Статистический пакет SPSS 16.0 использовался для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические и антропометрические характеристики пациентов и здорового контроля сведены в табл. 1.

Таблица 1.

Общая характеристика участников исследования

	Эндогенный гиперкортицизм Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	Здоровый контроль Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	P
Количество участников	40	40	
Пол ж(%) : м(%)	32 (80%) : 8 (20%)	31 (77%) : 9 (23%)	0,96
Возраст (лет)	30 (26—40) 20—56	28 (24—38) 21—57	0,37
Индекс массы тела (кг/м ²)	29,3 (25,5—34,1) 17,6—45,0	27,7 (23,8—32,4) 18,7—42,1	0,24
Кортизол в слюне в 23:00 (нмоль/л)	26,3 (20,0—43,8) 15,5—224,0	3,2 (2,0—4,1) 1,2—13,6	<0,0001
ИРФ1 (нг/мл)	167,7 (120,8—225,3) 25,8—426,5	212,1 (177,8—245,3) 121,3—630,1	0,003
25(ОН)D3 (нг/мл)	13,0 (8,1—20,2) 4,0—63,4	19,1 (14,0—27,0) 4,2—77,0	0,003
Остеокальцин (нг/мл)	7,1 (3,7—8,4) 2,1—30,8	17,6 (13,1—23,4) 5,9—36,5	<0,001
С-концевой телопептид коллагена I типа (нг/мл)	0,41 (0,29—0,63) 0,01—1,72	0,36 (0,25—0,53) 0,1—0,97	0,58

Все пациенты с эндогенным гиперкортицизмом имели повышенный уровень кортизола в суточной моче — 2575 (1184–4228) нмоль/л. Значительное подавление маркера костеобразования сочеталось с нормальным уровнем маркера костного разрушения. Корреляционная зависимость ОК и СТх, существующая среди здорового контроля ($\rho=0,724$ ($p<0,001$)) значительно ослаблялась среди пациентов с эндогенным гиперкортицизмом до статистически незначимого уровня ($\rho=0,285$ ($p=0,083$)). Уровень свободного кортизола в моче у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом коррелировал с уровнем остеокальцина $\rho=-0,464$ $p=0,003$, но связи не было выявлено с СТх $\rho=0,245$ ($p=0,132$).

Уровни экстрацеллюлярных белков антагонистов wnt-beta catenin сигнального пути представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Уровни экстрацеллюлярных белков антагонистов wnt-beta catenin сигнального пути

	Эндогенный гиперкортицизм Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	Здоровый контроль Me (Q ₂₅ -Q ₇₅) Мин-Макс	P
N	40	40	
Диккопф 1 (пг/мл)	440,49 (353,3—479,7) 185,6—502,5	448,8 (408,6—474,4) 208,8—494,4	0,53
Секретируемый связывающий белок фризельда 1 (нг/мл)	0,09 (0,07—0,11) 0,06—1,87	0,08 (0,07—0,11) 0,05—2,68	0,27
Склеростин (пг/мл)	784,8 (693,1—842,1) 377,2—910,0	680,2 (561,6—829,3) 303,4—924,9	0,032

Статистически значимые различия были найдены только для уровня склеростина. Интересно, что различия были обусловлены отсутствием низких значений склеростина, но не увеличением уровня протеина выше обнаруженных у здоровых людей (рис. 1). Уровень склеростина выше 662 пг/мл существенно чаще встречался среди больных гиперкортицизмом по сравнению со здоровыми людьми (ОШ=4,19 95% ДИ 1,44–12,22), $p=0,006$. По-видимому, из-за отсутствия повышения абсолютных значений склеростина его уровень не коррелировал с уровнем свободного кортизола в моче, слюне, а также ИРФ1. У здоровых людей наблюдалась корреляционная зависимость склеростина и РАНКЛ $\rho=-0,37$ ($p=0,018$), но не у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом $\rho=0,30$ ($p=0,057$).

Уровень РАНКЛ был подавлен у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем (0,083 (0,075–0,093) пмоль/л vs 0,106 (0,089–0,131) пмоль/л $p<0,001$ (рис. 2) и отрицательно коррелировал с уровнем свободного кортизола в моче $\rho=-0,452$ ($p=0,003$). При этом уровень остеопротегерина не отличался среди пациентов с гиперкортицизмом и здоровых людей (6,65 (4,92–7,66) пмоль/л vs 5,77 (5,00–6,40) пмоль/л $p=0,14$).

Среди пациентов с эндогенным гиперкортицизмом у 19 были выявлены низкотравматичные переломы (14 больных с множественными компрессионными переломами позвонков, 3 пациента имели перелом одного позвонка, в 1 случае был перелом бедра и в 3 случаях зафиксированы переломы ребер). Общая характеристика пациентов с переломами и без представлена в табл. 3.

Таблица 3.

Основные характеристики пациентов, в зависимости от наличия или отсутствия низкотравматичных переломов

	Эндогенный гиперкортицизм		P
	С низкотравматичными переломами Me (Q25-Q75)	Без низкотравматичных переломов Me (Q25-Q75)	
N	19	21	
Пол ж (%) : м (%)	11 (57,9%) : 8	21 (100%) : 0	0,021
Возраст (лет)	34 (23—39)	29 (23—39)	0,11
Индекс массы тела (кг/м ²)	26,0 (21,9—29,7)	33,2 (28,7—36,5)	0,001
Св. кортизол в моче (нмоль/л)	4012 (2260—6180)	1370 (935—2592)	0,001
Инсулиноподобный фактор роста 1 (нг/мл)	146,5 (91,4—182,2)	204,0 (138,5—243,7)	0,06
Остеокальцин (нг/мл)	4,3 (2,7—7,5)	8,0 (4,9—9,9)	0,02
С-концевой телопептид коллагена I типа (нг/мл)	0,43 (0,35—0,70)	0,33 (0,24—0,47)	0,46
РАНКЛ (пмоль/л)	0,08 (0,07—0,09)	0,09 (0,08—0,10)	0,02
Остеопротегерин (пмоль/л)	7,24 (5,95—8,11)	5,20 (4,37—7,25)	0,04
Диккопф1 (пг/мл)	442,8 (321,6—487,5)	408,7 (376,9—459,7)	0,67
Секретируемый белок фризельда 1 (нг/мл)	0,089 (0,080—0,108)	0,092 (0,077—0,114)	0,57
Склеростин (пг/мл)	761,8 (666,8—821,4)	790,4 (708,8—858,6)	0,28
L ₁ —L ₄ Z-критерий	–2,2 (–2,9—–1,0)	–2,1 (–2,6—–0,95)	0,63
Neck Z-критерий	–1,7 (–2,3—–0,8)	–1,0 (–1,4—–0,6)	0,19

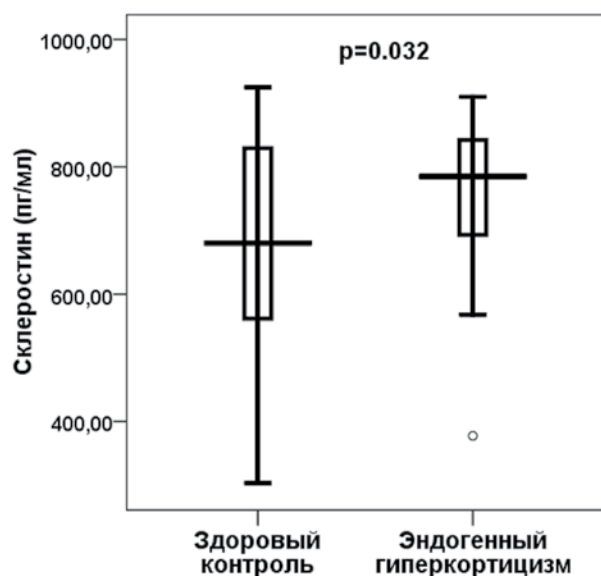


Рис. 1.

Уровень склеростина в сыворотке крови у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем.

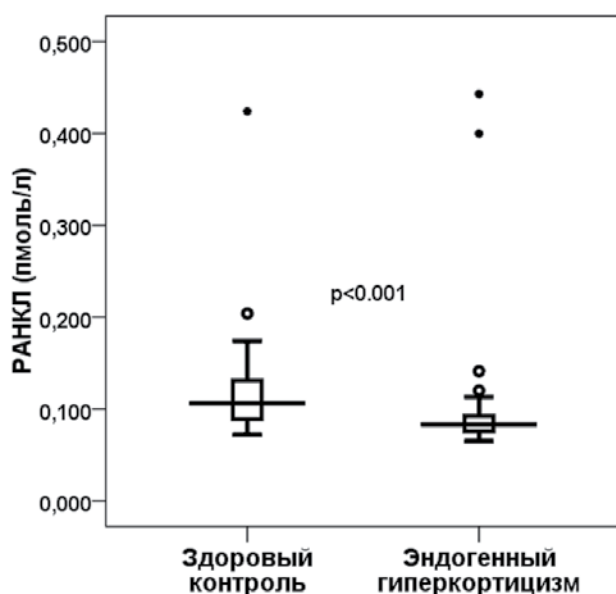


Рис. 2.

Уровень рецептора активатора ядерного фактора каппа бета (РАНКЛ) в сыворотке крови у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем.

Обнаружив различия в нескольких параметрах, подавляющее большинство которых коррелировали с уровнем свободного кортизола в моче, мы применили многофакторный анализ с введением в модель 5 основных переменных (пол, ИМТ, уровень свободного кортизола в моче, ОК, ИРФ1). Включение этих показателей позволило выявить повышение ИМТ как протективный фактор развития переломов: ОШ 0,784 (95% ДИ 0,628—0,980) $p=0,032$.

ДИСКУССИЯ

В представленном исследовании впервые было продемонстрировано повышение и отсутствие низких значений уровня склеростина в сыворотке крови у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, в то время как верхние границы склеростина не отличались от здорового контроля. В попу-

ляционном исследовании было показано увеличение абсолютных значений уровня склеростина с возрастом [30, 31], у пациентов с гипопаратиреозом [32], сахарным диабетом 2 типа [33, 34], а также у иммобилизованных из-за инсульта людей [35]. В исследовании у грызунов (мышей) применение дексаметазона повышало экспрессию SOST — гена, кодирующего склеростин [36]. Антитела к склеростину предупреждали потерю костной ткани, спровоцированную ГК [36]. Выявленное повышение склеростина у пациентов с ЭГ в нашем исследовании согласуется с экспериментальными данными у животных. Кроме того, проанализировав распределение уровня склеростина у пациентов с ЭГ, мы выявили статистически значимое преобладание высоких концентраций белка и отсутствие его низких значений у пациентов с ЭГ (ОШ=4,19 95% ДИ 1,44—12,22) $p=0,006$. Таким образом, результат нашей работы демонстрирует важность колебания уровня склеростина для костеобразования (наличие низких значений белка), возможно, даже в большей степени, чем его абсолютное значение. Склеростин секретируется остеоцитами [37—39] и, следовательно, является наиболее специфичным белком для костной ткани. Мы не выявили статистически значимых отличий в уровне других внеклеточных ингибиторов Wnt/b-catenin сигнального пути (Дкк 1 и сФР31) у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем, хотя в экспериментальных работах супрафизиологический уровень ГК увеличивал экспрессию сФР31 в культуре мезенхимальных клеток и остеобластов крысы [40]. Подавление экспрессии Дкк1 позволило избежать негативного влияния глюкокортикоидов на культурах клеток мышей, остеобластах крысы и человека [41, 42]. По-видимому, эти изменения менее значимы или нивелируются при воздействии эндогенных ГК на организм человека.

Вместе с тем преднизолон был эффективен для снижения костеобразования и предупреждения дальнейшего увеличения костной массы у 19-летнего пациента с генетически подтвержденной болезнью Ван Бучема, что позволило авторам предположить, что склеростин не вовлечен в подавление костеобразования, наблюдающееся при применении ГК [43]. Болезнь Ван Бучема — гомозиготное рецессивное заболевание, связанное с мутацией в гене SOST [44], сопровождающееся нарушением экспрессии склеростина. Однако, в отличие от склеростоза, при котором мутация происходит в кодирующей части гена, при болезни Ван Бучема страдает регуляторный элемент гена SOST и, следовательно, болезнь Ван Бучема относится к гипоморфным мутациям [45]. Клинически болезнь Ван Бучема протекает мягче по сравнению с склеростозом, и есть данные о сохраненной секреции склеростина внутритрубно [45]. Теоретически нельзя исключить экспрессию неизмененного гена SOST под влиянием преднизолона.

Анализируя изменения костной резорбции у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, мы не нашли статистически значимого отличия уровня маркера костного разрушения по сравнению со здоровым контролем. Однако, учитывая подавленный уровень ОК, СТх был несопоставимо высоким, кроме того, терялась корреляционная зависимость маркеров костного обмена, что может свидетельствовать о разобщении костного обмена. Вместе с тем мы получили статистически значимое снижение уровня РАНКЛ в сыворотке крови пациентов с эндогенным гиперкортицизмом по сравнению со здоровым контролем. РАНКЛ коррелировал с уровнем свободного кортизола в суточной моче. Более того, у пациентов с низкотравматичными переломами на фоне гиперкортицизма наблюдались статистически значимое повышение ОПГ и ещё более низкий уровень RANKL по сравнению с больными без переломов.

Исследования в культурах клеток, в том числе остеобластов человека, продемонстрировали подавление экспрессии ОПГ и активацию РАНКЛ при введении глюкокортикоидов

[46]. У мышей с дефицитом остеопротегерина наблюдались развитие остеопороза и артериальная кальцификация [47], что в какой-то степени характерно для пациентов с эндогенным гиперкортицизмом. Однако несколько исследований, у пациентов с ЭГ продемонстрировали увеличение уровня ОПГ [48, 49], в одном исследовании увеличение уровня ОПГ сочеталось с уменьшением уровня РАНКЛ [49], что наблюдалось и в нашей работе.

На основании полученных данных мы можем предположить, что регуляция относительно повышенного костного разрушения осуществляется по альтернативному механизму, а РАНКЛ и ОПГ, измеренные в нашем исследовании имели другое происхождение. Кроме экспрессии в костной ткани РАНКЛ экспрессируется клетками иммунной системы, в частности активированными Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и дендритными клетками [50-52]. Наиболее вероятно, изменения РАНКЛ/ОПГ связаны с подавлением иммунитета у пациентов с гиперкортицизмом. Инфекция — частое осложнение ЭГ и наиболее частая причина смерти этих пациентов [26, 53].

ВЫВОД

Уровень склеростина отличается у пациентов с эндогенным гиперкортицизмом, главным образом, из-за отсутствия низких значений белка. Среди других антагонистов wnt/betacatenin сигнального пути (Dkk1, сФРЗ1), а также молекул РАНКЛ/ОПГ, склеростин представляется наиболее многообещающей молекулой для терапевтического воздействия у пациентов с глюкокортикоидным остеопорозом, в частности при эндогенном гиперкортицизме.

Финансирование: работа поддержана грантом Президента для молодых учёных № МК-6978.2010.

SUMMARY

Purpose. Endogenous Cushing's syndrome (CS), usually affecting young and otherwise healthy patients, is a good model to validate the effects of supraphysiological levels of glucocorticoids in humans. This study evaluates circulating levels of extracellular antagonists of Wnt/ β -catenin signaling pathway (sclerostin, Dickkopf 1 (Dkk1), secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)) along with osteoprotegerin (OPG) and soluble receptor activator of nuclear factor kappa-beta ligand (RANKL) in patients with CS as compared to healthy individuals.

Materials and methods. Forty patients with clinically and biochemically evident CS and 40 sex, age and body-mass index matched healthy individuals provided fasting serum samples (8:00-10:00AM) for measurement of sclerostin, SFRP1 and Dkk1, RANKL, OPG along with bone turnover markers. Serum samples on RANKL, OPG, Dkk1, SFRP1, sclerostin were frozen and then concurrently measured by an enzyme immunoassay (ELISA) using commercially available reagents. Serum samples on osteocalcin (OC), carboxyterminal cross-linked telopeptide of type I collagen (CTX), cortisol in serum and saliva were assayed by electrochemiluminescence (ECLIA) Cobas e601 Roche. Urinary free cortisol (24hUFC) was measured by an immunochemiluminescence assay (extraction with diethyl ether) on a Vitros ECI. All participants were questioned regarding any recent low traumatic fractures. Patients with CS underwent standard spinal radiographs in anterior-posterior and lateral positions of the vertebrae Th4-L4 (Axiom Icons R200 "Siemens").

Results. Patients with CS (30 (26-40) years old with 24hUFC 2575 (1184-4228) nmol/l (Me (Q25-Q75)) had suppressed OC and normal CTx levels as compared to healthy subjects. A significant correlation, which we observed between OC and CTx ($p=0.724$ ($p<0.001$)) among the healthy volunteers, weakened to a non-significant level ($p=0.285$ ($p=0.083$)) when analyzing patients with CS only. 24hUFC correlated with OC $p=-0.464$

$p=0.003$, but not with CTx $p=0.245$ ($p=0.132$) in patients with CS. Patients with CS had higher sclerostin levels versus healthy control subjects ($p=0.032$). Differences in sclerostin were due to the lack of lower sclerostin values rather than an increase in protein levels above the upper-limits of the healthy control individuals. Sclerostin levels higher than 662 pg/ml were four times more frequent in patients with CS as compared to healthy subjects (OR=4.19, 95% CI 1.44-12.22), $p=0.006$.

Dkk1, SFRP1 did not differ from the control group. Patients with CS had a significantly lower level of RANKL (0.083 (0.075-0.093) pmol/L) as compared to healthy subjects (0.106 (0.089-0.131) pmol/L) $p<0.001$. Conversely, no difference was found between the OPG level in patients with CS (6.65 (4.92-7.66) pmol/L) and healthy individuals (5.77 (5.00-6.40) pmol/L), $p=0.14$. RANKL was lower ($p=0.02$) and OPG was higher ($p=0.04$) in patients with CS and low traumatic fractures ($n=19$) versus patients without fractures ($n=21$).

Conclusions. Patients with CS have higher sclerostin level as compared to healthy subjects. Hypercortisolism prevents the normal physiological suppression of sclerostin rather than raising its absolute level. Of all the tested proteins (sclerostin, Dkk1, SFRP1, RANKL, OPG) only sclerostin seems to be a promising therapeutic approach to treating osteoporosis in patients with endogenous CS.

Keywords. Sclerostin, Dickkopf 1, Secreted frizzled related protein 1, Cushing's syndrome, Glucocorticoid induced osteoporosis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton LJ III, Tenenhouse A, Reeve J, Silman AJ, Pols HA, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D.: A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk.// J. Bone and Mineral Research, 2004, Vol. 19, pp. 893—899.
2. Staa TP, Leufkens HG, Abenham L, Zhang B, Cooper C.: Use of oral corticoids and risk of fractures.// J. Bone and Mineral Research, 2000, Vol. 15, pp. 933—1000.
3. Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е. Стероидный остеопороз при эндогенном гиперкортицизме// в книге болезней Иценко-Кушинга, под ред акад. Дедова И.И. и член-корр Мельниченко Г.А. М., 2011. С. 282—297.
4. Tauchmaonova L, Pivonello R, Di Somma C, Rossi R, De Martino MC, Camera L, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A.: Bone Demineralization and vertebral fractures in endogenous cortisol excess: role of disease etiology and gonadal status.// J. Clin Endocrinol. Metab., 2006, Vol. 91, pp. 1779—1784.
5. Sornay-Rendu E, Munoz F, Garnero P, Duboeuf F, Delmas PD.: Identification of osteopenic women at high risk of fracture: the OFELY study.// J. Bone Miner. Res., 2005, Vol. 20, pp. 1813—1819.
6. Garnero P, Delmas PD.: Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women.// J. Musculoskel Neuron Interact, 2004, Vol. 4, pp. 50—63.
7. Lukert BP, Higgins JC, Stoskopf MM.: Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids.// J. Clin Endocrinol Metab, 1986, Vol. 62, pp. 1056—1058.
8. Barahona MJ, Sucunza N, Resmini E, Fernandez-Real JM, Ricart W, Moreno-Navarrete JM, Puig T, Wagner AM, Rodriguez-Espinosa J, Farrerons J, Webb SM.: Deleterious effects of glucocorticoid replacement on bone in women after long-term remission of Cushing's syndrome.// J. Bone Miner Res, 2009, Vol. 24, pp. 1841—1846.
9. Sartorio A, Conti A, Ferrario S, Passini E, Re T, Ambrosi B.: Serum bone Gla protein and carboxyterminal cross-linked telopeptide of type I collagen in patients with Cushing's syndrome.// Postgrad Med J., 1996, Vol. 72, pp. 419—422.
10. Szappanos A, Toke J, Lippai D, Patocs A, Igaz P, Szucs N, Futo L, Glaz E, Racz K, Toth M.: Bone turnover in patients with endogenous Cushing's syndrome before and after successful treatment.// Osteoporosis International, 2010, Vol. 21, pp. 637—645.
11. Kristo C, Jemtland R, Ueland T, Godang K, Bollerslev J.: Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: a prospective long-term study.// European J. Endocrinology, 2006, Vol. 154, pp. 109—118.
12. Kaltsas G, Makras P.: Skeletal diseases in Cushing's syndrome: osteoporosis versus arthropathy.// Neuroendocrinology, 2010, Vol. 92 (suppl 1), pp. 60—64.

13. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006;116:1202—1209.
14. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens).* 2007;6:279—94.
15. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *J. Gene.* 2004, Vol. 341, pp. 19—39.
16. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J. Cell Science.* 2003, Vol. 116, pp. 2627—2634.
17. Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Hul WV. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J. Journal of Bone and Mineral Research.* 2004, Vol. 19, pp. 1749—1757.
18. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999, Vol. 140, pp. 4382—4389.
19. Swanson C, Lorentzon M, Conaway HH, Lerner UH. Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB in mouse calvarial bones. *Endocrinology.* 2006, Vol. 147, pp. 3613—3622.
20. Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgstrom F, Cooper C, Diez Perez A, Eastell R, Hofbauer LC, Kanis JA, Langdahl BL, Lesnyak O, Lorene R, McCloskey E, Messina OD, Napoli N, Obermayer-Pietsch B, Ralston SH, Sambrook PN, Silverman S, Sosa M, Stepan J, Suppan G, Wahl DA, Compston JE, Joint IOF-ECTS GIO Guidelines Working Group. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporosis International*, published online 21 March 2012.
21. Nijweide P J, Jean H. M. Feyen E. Cells of Bone: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiological Reviews* 1986 Vol. 66, pp:855—886.
22. Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis International.* 2007, Vol. 18, pp. 1319—1328.
23. Van Hozegand RA, Hamdy NA. Skeletal morbidity in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterology.* 2006, Vol. 243, S59—S64.
24. Lekamwasam S, Trivedi DP, Khaw KT. An association between respiratory function and bone mineral density in women from the general community: a cross sectional study. *Osteoporosis Int* 2002, Vol.13, 710—715.
25. Беляя Ж.Е., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Рожинская Л.Я., Драгунова Н.В., Дзеранова Л.К., Огнева Н.А., Бутрова С.А., Трошина Е.А., Колесникова Г.С., Дедов И.И.: Автоматизированный электромиоимпедансный метод определения кортизола в слюне для диагностики эндогенного гиперкортицизма среди пациентов с ожирением. // Ж. Ожирение и метаболизм, 2011, том 27, № 2, стр. 56—63.
26. Nieman LK, Biller BMK, Finding JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism.* 93, 1526—1540 (2008).
27. Watts NB, Bilezikian JP, Camacho PM, Greenspan SL, Harris ST, Hodgson SF, Kleerekoper M, Luckey MM, McClung MR, Pollack RP, Petak SM; AACE Osteoporosis Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Pract.* 2010 Vol.16 Suppl 3, pp.1—37.
28. Genant HK, Wu CY, van Kujik C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J. Bone Miner Res.* 1993, Vol. 8 (9), pp. 1137—1148.
29. Afina S, Glas, Jeroen G, Lijmer, Martin H, Prins, Gouke J, Bonsel, Patrick M.M. Bossuyt. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *Journal of Clinical Epidemiology.* 56 (2003), 1129—1135.
30. Ardawi MM, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J. Bone and Mineral Research.* 2011, Vol. 26, pp. 2812—2822.
31. Modder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton III LJ, Khosla S. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin level in women and men. *J. Bone Miner Res.* 2011, Vol. 26, pp. 373—379.
32. Costa AG, Cremers S, Rubin MR, McMahon DJ, Sliney JJ, Lazaretti-Castro M, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Circulating sclerostin in disorders of parathyroid gland function. *J. Clin Endocrinol Metab.* 2012, Vol. 97, pp. 1737—1744.
33. Garcia-Martin A, Rozas-Moreno P, Reyes-Garcia R, Morales-Santana S, Garcia-Fontana B, Garcia-Salcedo JA, Murioz-Torres M. Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin Endocrinol and Metab.* 2012, Vol. 97, pp. 234—241.
34. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, Ceccarelli E, Ruvio M, Pietrini MG, Capodarca C, Beatrice Franci M, Campagna MS, Calabro A, Cataldo D, Stokakis K, Dotta F, Nuti R. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2012, Vol. 97, pp. 1737—1744.
35. Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA, Pulvirenti I, Hawa G, Tringali G, Fiore CE. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *J Clin Endocrinol and Metab.* 2010, Vol. 95, pp. 2248—2253.
36. Marenzana M, Greenslade K, Eddleston A, Okoye R, Marshall D, Moore A, Pobinson MK. Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. *Arthritis Rheum.* 2011, Vol. 63, pp. 2385—2395.
37. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J. Exp. Med.* 2004, Vol. 199, pp. 805—814.
38. Poole KES, van Bezooijen RL, Loveridge N, et al. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.* 2005, Vol. 19, pp. 1842—1844.
39. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowil CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth factor Rev.* 2005, Vol. 16, pp. 319—327.
40. Wang F-S, Lin C-L, Chen Y-J, Wang C-J, Yang KD, Huang Y-T, Sun Y-C, Huang H-C. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. *J. Endocrinology.* 2005, Vol. 146, pp. 2415—2423.
41. Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004.
42. Wang F-S, Ko J-Y, Yeh D-W, Ke H-C, Wu H-L. Modulation of dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation and bone mass loss. *Endocrinology.* 2008, Vol. 149, pp. 1793—1801.
43. Lierop AHJM, Hamdy NAT, Papapoulos SE. Glucocorticoids are not always deleterious for bone. *J. Bone and Mineral Research.* 2010, Vol. 25, pp. 2796—2800.
44. Wergedal JE, Veskovic K, Hellan M, Nygth C, Balemans W, Libanati C, Vanhoenacker FM, Tan J, Baylink DJ, Van Hul W. Patients with Van Buchem disease, an osteosclerotic genetic disease, have elevated bone formation markers, higher bone density, and greater derived polar moment of inertia than normal. *J. Clin Endocrinol Metab.* 2003, Vol. 88, pp. 5778—5783.
45. Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, Ovcharenko D, Plajzer-Frick I, Rubin EM. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res.* 2005, Vol. 15, pp. 928—935.
46. Hofbauer LC, Schopet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANK/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA.* 2004, Vol. 292, pp. 490—495.
47. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and Development.* 1998, Vol. 12, pp. 1260—1268.
48. Diovio A, Allasino B, Palmas E, Ventura M, Pia A, Saba L, Arosio E, Terzolo M, Angeli A. Increased Osteoprotegerin levels in Cushing's syndrome are associated with an adverse cardiovascular risk profile. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2007, Vol. 92, pp. 1803—1808.
49. Camozzi V, Sanguin F, Albiger N, Scaroni C, Mantero F, Zaninotto M, Frigo A, Piccolo M, Luisetto G. Persistent increase of osteoprotegerin levels after cortisol normalization in patients with Cushing's syndrome. *European J. Endocrinology.* 2010, Vol. 162, pp. 85—90.
50. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Olivera-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Pennington JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999, Vol. 397, pp. 315—323.
51. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997, Vol. 390, pp. 175—179.
52. Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.* 1999, Vol. 189, pp. 1025—1031.
53. Pivonello R, Melnichenko G, Zacharieva S, Gu F, Oscar B, Shah NS, Gaillard R, Colao A. Mission study: an international observational study on the mortality in Cushing's syndrome. *Endocrine Abstracts.* 2011, Vol. 26, P 32.