

Маркеры метаболизма КОСТНОЙ ТКАНИ

15

Продукты деградации коллагена I типа 679 Протеогликаны 680
Белки, обеспечивающие межклеточное взаимодействие 681
Локальные факторы, регулирующие функцию костных клеток 681
Регуляция остеокластогенеза 684
Системные факторы, регулирующие функцию костных клеток 686

МАРКЕРЫ, ОПИСАННЫЕ В I ТОМЕ КАТАЛОГА

Агрекан / Гиалуроновая кислота / Гомоцистеин / Кальцитонин / Карбокситерминальные пропептиды проколлагена I типа / Катепсин К / Костный изофермент щелочной фосфатазы / Матриксные металлопротеиназы (ММР) / Олигомерный матриксный белок / Остеокальцин / Пиридинолин и дезоксипиридинолин / Спиралевидные участки α -цепи коллагена I типа (helical peptide) / Тарпрат-резистентная кислая фосфатаза / Хрящевой гликопротеин-39 / 1,25(OH)₂ витамин D₃ / 25-ОН витамин D / Dkk-1 / sRANKL и остеопонегерин / TRAIL / β -CrossLaps

сокращения раздела:

ОБ – остеобласт
ОК – остеокласт
ОКН – остеокальцин

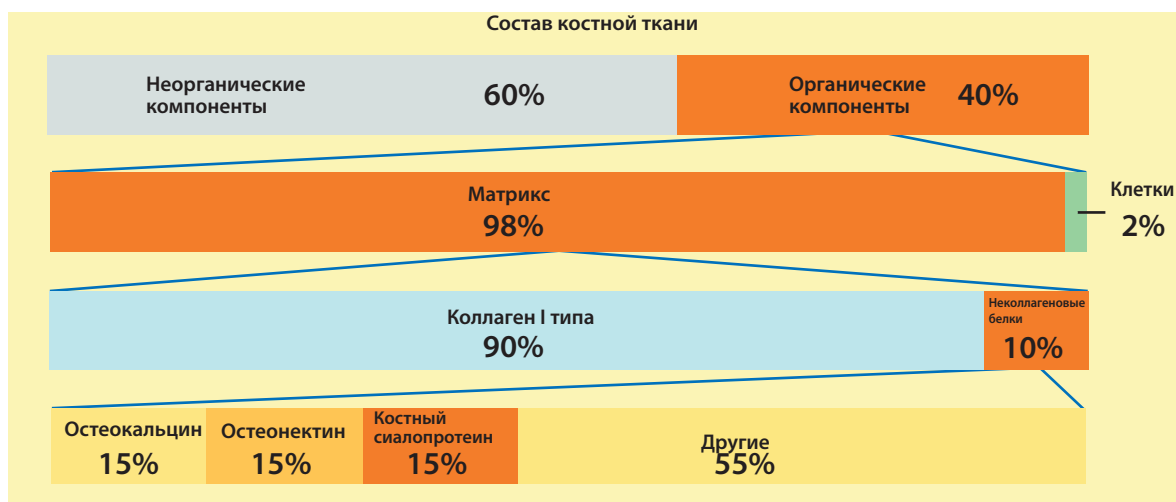
ОП – остеопороз
IFN- γ – интерферон γ
IL – интерлейкин

TNF- α – фактор некроза
опухолей α

Кость – это соединительная ткань, состоящая из клеток, погруженных в твердое основное вещество. Около 30% матрикса составляют органические соединения, преимущественно в форме коллагеновых волокон, а остальные 70% – неорганические. Главный неорганический компонент кости представлен гидроксипатитом, содержащим кальций и фосфат; в кости также содержатся в различных количествах натрий, магний, калий, хлор, фтор, карбонат и цитрат. **Органический матрикс кости** представлен на 90% коллагеном и на 10% неколлагеновыми белками, которые важны для регуляции минерализации и укрепления основы коллагена. Органические вещества костного матрикса синтезируются остеобластами (ОБ). Наиболее распространенным органическим компонентом в костной ткани является коллаген I типа.

Среди неколлагеновых белков костной ткани выделяют следующие группы:

- протеогликаны (кислые полисахариды и гликозаминогликаны: хондроитинсульфат и гепарансульфат) обеспечивают консолидацию коллагеновых волокон и их связь с кристаллами минералов;
- белки, обеспечивающие межклеточное взаимодействие: тромбоспондин, костный сиалопротеин, остеопонтин, фибронектин, витронектин; первые три способны связывать ионизированный кальций;
- гликопротеины (щелочная фосфатаза, остеонектин);
- γ -карбоксилированные белки – матриксный gla-белок и остеокальцин (ОКН, синтезируется ОБ) – стимуляторы ремоделирования костной ткани; активность ОКН считается маркером скорости костеобразования;
- белки, стимулирующие рост кости (факторы роста – инсулиноподобный фактор роста-1,



трансформирующий фактор роста, тромбоцитарный фактор роста, фактор роста фибробластов, костные морфогенетические белки) – цитокины, синтезируемые клетками костной ткани и крови, осуществляющие местную регуляцию остеогенеза.

Остеопороз (ОП) – системное заболевание скелета, характеризующееся уменьшением костной массы и нарушением микроархитектоники костной ткани, следствием чего является хрупкость костей, ведущая к увеличению частоты переломов (Международная конференция по остеопорозу, Амстердам, 1996). Распространенность этого заболевания, охватывающая, по данным разных авторов, от 2 до 10% населения, значительно увеличивается с возрастом. В основе патогенеза любого варианта ОП лежит дисбаланс процессов костного ремоделирования – костеобразования и костной резорбции: преобладает либо ускоренная резорбция, либо сниженное костеобразование, в некоторых случаях наблюдается замедление обеих составляющих костного обмена.

Продукты деградации коллагена I типа

С-телопептиды (α CrossLaps, α-CTX)

Костный матрикс подвергается постоянному обновлению. В ходе синтеза основного белка матрикса – коллагена I типа – сначала образуются аминокислотные цепи (α1 и α2), которые, объединяясь в соотношении 2:1, формируют трех-

спиральную структуру молекул проколлагена. Проколлаген секретируется ОБ во внеклеточную среду: здесь от него отщепляются концевые пропептиды, а образовавшийся при этом еще незрелый коллаген включается в построение фибрилл. Созревание коллагена происходит в результате ряда модификаций его молекул в составе фибрилл и их соединения поперечными пиридиновыми сшивками.

Во время обновления костной ткани коллаген I типа деградирует, небольшие пептидные фрагменты попадают в кровь и выделяются почками. Отщепление С-телопептидов происходит на самом начальном этапе деградации коллагена, поэтому метаболиты коллагена не влияют на концентрацию С-телопептидов.

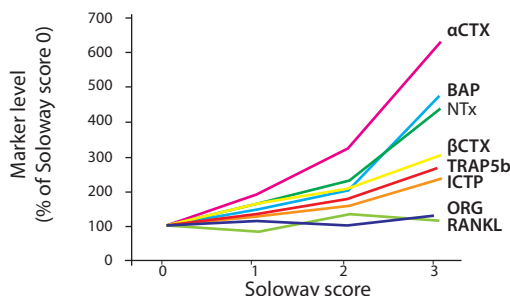
Структура коллагена I типа и локализация CrossLaps эпитопа



Основными продуктами деградации С-телопептидов коллагена I типа, экскретируемыми с мочой, являются структуры, известные как CrossLaps, которые состоят из двух октапептидов (8АА), связанных пиридиновой или пирроловой поперечной сшивкой. Во вновь сформированной кости по-

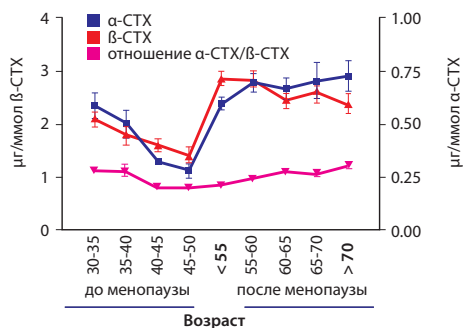
следовательности 8AA содержат α-аспарагиновую кислоту, но по мере старения кости эта кислота изомеризуется в β-форму (т.е. степень изомеризации пропорциональна возрасту кости).

α-CrossLaps (α-CTX) – чувствительный маркер метастазов кости у больных раком молочной железы, легких и простаты



Leeming et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15(1):32-8.

Зависимость уровней α-CrossLaps и β-CrossLaps от возраста



У женщин уровни α- и β-CrossLaps (α- и β-CTX) уменьшаются вплоть до менопаузы, увеличиваются в течение менопаузы и далее остаются стабильными.

Специфичность тест-системы α-CrossLaps ELISA фирмы IDS обеспечивается применением двух форм моноклональных антител, каждая из которых связывается с концевыми линейными октапептидами (8AA) α1-цепи коллагена I типа. Используемые моноклональные антитела специфически распознают линейные октапептиды, содержащие α-аспарагиновую кислоту. Измерение α-CrossLaps в моче позволяет оценить темпы деградации коллагена относительно недавно сформированной

кости (не подвергшегося изомеризации), а также может быть использовано в качестве дополнительного теста для идентификации костных метастазов у пациентов с раком молочной железы и простаты (рис.) Кроме того, определение α-CrossLaps может использоваться в качестве дополнения при диагностике болезни Педжета и контроле антирезорбтивной терапии.

Протеогликаны

Протеогликаны – это сложные соединения полисахаридов с белком. Биосинтез протеогликанов в костной ткани осуществляется главным образом активированными ОБ и в незначительной степени зрелыми остеоцитами.

Полисахариды, входящие в состав протеогликанов, представляют собой линейные полимеры, построенные из разных дисахаридных субъединиц, образованных уруновыми кислотами (глюкуроновой, галактурановой и идуроновой), N-ацетилгексозаминами (IM-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин) и нейтральными сахарами (галактозой, маннозой и ксилозой). Эти полисахаридные цепи называются гликозаминогликанами (GAG). Зрелая костная ткань содержит в основном сульфатированные гликозаминогликаны, такие как хондроитин-4- и хондроитин-6-сульфаты, дерматан-сульфат и кератан-сульфат.

Сульфатированные гликозаминогликаны (sGAG)

GAG, которые раньше называли мукополисахаридами, несут большой отрицательный заряд, высоко гидрофильны, обладают сильно вытянутой конформацией и образуют гели уже при низких концентрациях. Привлечение GAG осмотически активных катионов вызывает набухающее давление (тургор матрикса), что придает матриксу способность противостоять силам сжатия. Так как GAG образуют пористые гидратированные гели, они заполняют большую часть объема пространства и обеспечивают опору тканям, при этом позволяя диффундировать водорастворимым молекулам и мигрировать клеткам в соответствии с их размером и зарядом. Функциональное значение GAG в соединительной ткани велико и связано в первую очередь с формированием коллагеновых и эласти-

новых волокон. GAG участвуют практически во всех процессах обмена соединительной ткани и могут оказывать модулирующее влияние на дифференцировку клеточных элементов. От их качественных и количественных характеристик в тканях, а также специфики взаимодействия с другими компонентами межклеточного матрикса, зависят многие показатели регенерации соединительной ткани.

Известно, что в норме GAG практически отсутствуют в свободном виде. При патологических состояниях, когда матрикс подвергается разрушению, идет их высвобождение, и они способны проявлять свои уникальные свойства. Как показано в экспериментальных и клинических исследованиях, GAG снижают активность протеолитических ферментов, подавляют синергическое разрушительное действие на межклеточный матрикс этих ферментов и кислородных радикалов, блокируют синтез медиаторов воспаления за счет маскировки антигенных детерминант и отмены хемотаксиса, предотвращают апоптоз клеток, индуцированный повреждающими факторами, а также угнетают синтез липидов и с помощью этого механизма препятствуют процессам деградациии ткани. Одновременно эти соединения способны принимать непосредственное участие в построении коллагеновых волокон и межклеточного матрикса в целом, стимулировать пролиферацию хондроцитов и других клеток соединительной ткани, повышать их биосинтетическую активность и улучшать сосудистую микроциркуляцию непосредственно в соединительной ткани. Кроме того, на ранних этапах повреждения они выступают как инициаторы создания в соединительной ткани временного матрикса. Этот феномен имеет очень важное значение, так как позволяет приостановить как распад соединительной ткани, так и формирование грубого рубца. В дальнейшем именно последнее и обеспечивает более быстрое замещение рубцовой ткани на обычную для данного органа соединительную ткань.

Белки, обеспечивающие межклеточное взаимодействие

Костный сиалопротеин (BSP)

BSP или сиаловый белок, составляет 5-10% неколлагеновых белков костного матрикса и является одним из основных продуктов синтетиче-

ской функции активных ОБ и одонтобластов. Хотя BSP имеет ряд признаков, сходных с таковыми у остеопонтина, но эти белки кодируются разными генами. В развивающейся кости он появляется одновременно с началом минерализации. Предполагают, что частично этот белок включается во вновь сформированный остеоид, а частично оказывается на его поверхности, где способствует адгезии остеокластов (ОК). В процессе резорбции сиалопротеин переходит во внеклеточную жидкость и далее в сосудистое русло. Измерение BSP проводится при мониторинге HRT (заместительной терапии эстрогенами) в постменопаузе. В одном из исследований сывороточный BSP измерялся у 82 женщин в постменопаузе и сопоставлялся с такими биохимическими маркерами резорбции кости, как дезоксипиридинолин, пиридинолин, N-концевой телопептид и маркерами костеобразования: сывороточным ОКН и костной щелочной фосфатазой. Через год после начала HRT уровни BSP снизились на 52%. Между вышеперечисленными маркерами и гистоморфометрическими показателями резорбции кости была получена хорошая корреляция. К настоящему времени обнаружены и внескелетная локализация BSP, но количество маркера за границами костной ткани невелико. Показано присутствие BSP в трофобластических клетках, которые принимают участие в процессе взаимодействия материнских тканей и тканей плода, образуют синтиций, позволяющий осуществить проникновение питательных веществ, и подвергаются минерализации на поздних стадиях беременности. BSP содержится также в минерализованных участках опухолей молочной железы (на поздней стадии) и в атеросклеротических бляшках.

Локальные факторы, регулирующие функцию костных клеток

Предшественниками ОБ (а также костномозговых стромальных клеток, хондроцитов, мышечных клеток и адипоцитов) являются мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, а предшественниками ОК – гемопоэтические клетки моноцитарно-макрофагальной линии. Развитие и дифференцировка ОБ и ОК контролируется синтезирующимися в костном мозге фак-

торами роста, другими цитокинами и молекулами адгезии, которые обеспечивают взаимодействие между клетками и между клетками и матриксом, а также опосредуют эффекты системных гормонов и механических сигналов. Свое влияние они реализуют преимущественно локально, действуя на мембранные контакты, что и позволяет определять их эффекты как паракринные или аутокринные. Необходимо подчеркнуть, что в процессе старения организма взаимодействие гормонов с факторами роста и другими цитокинами подвергается существенным изменениям, а активность многих локальных факторов снижается.

Инсулиноподобные факторы роста (IGF)

IGF – семейство полипептидов с м.м. 76 кДа, способных стимулировать деление клеток-мишеней. Синтез IGF регулируется соматотропином. Описано две формы IGF (I и II), при этом IGF-I в 7 раз активнее IGF-II. Физиологические количества паратормона усиливают синтез IGF-I, а глюкокортикоиды, напротив, угнетают. IGF-I увеличивает синтез и ингибирует распад коллагена, усиливает образование костного матрикса, стимулирует деление ОБ. IGF-I вовлечен в эстрогенное действие на скелет, поскольку его продукция в печени и других органах регулируется эстрогенами. Эти и сходные наблюдения свидетельствуют о том, что IGF-I может быть вовлечен в остеогенез и гомеостаз костной ткани. Костные клетки синтезируют не менее шести IGF-связывающих белков, которые увеличивают тропность цитокина к клеткам-мишеням. В крови определяется главным образом белок-3, связывающий IGF-I, который потенцирует его эффекты. Было показано, что комбинированное введение IGF-I и IGFBP-3 способствует истончению костных трабекул у крыс. IGFBP-4 блокирует эффекты IGF, в то время как IGFBP-5, напротив, усиливает стимулирующее действие IGF на ОБ.

Трансформирующий фактор роста β (TGF β)

К семейству TGF β относятся 5 белков. Биологические эффекты этих белков опосредуются взаимодействием со специфическими клеточными рецепторами, которые экспрессируются на костных клетках. Большое количество TGF β 1 находится в костной ткани, где он является регулятором процессов резорбции и формирования костной тка-

ни. В пользу этого свидетельствуют следующие данные: показано, что он ингибирует зрелые ОК и пролиферацию мононуклеарных ОК; стимулирует пролиферацию и дифференцировку преОБ *in vitro*. Синтез TGF β усиливается под влиянием половых гормонов и кальцитриола. Введение TGF β рядом с надкостницей у молодых крыс стимулирует образование костной и хрящевой ткани. mRNK TGF β 2 присутствует в эмбриональной ткани и рудиментах хряща, и это свидетельствует о его роли в развитии скелета.

Фактор роста фибробластов (FGF)

FGF объединяет семейство, по крайней мере, из семи гомологичных полипептидов, содержащих 150-250 аминокислотных остатков. О потенциальном вовлечении FGF в костное формирование свидетельствует его роль в образовании мезодермы, экспрессия в костной ткани в процессе ее развития, при ангиогенезе, продукция эндотелиальными клетками, макрофагами и костными клетками. FGF можно экстрагировать из костной ткани, затем смешать с остеогенным костным матриксом, и он будет увеличивать количество образованной кости. Локальные инъекции в место перелома FGF у крыс стимулируют увеличение хряща. Между FGF и продукцией других факторов роста существует много взаимосвязей, например, FGF может индуцировать продукцию TGF β в ОБ. Возможно, различные факторы роста влияют на матрикс, выстраивая клетки в правильной последовательности и увеличивая количество сформированной кости.

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)

PDGF – димерный полипептид с молекулярной массой 30 кДа; продуцируется тромбоцитами, макрофагами и некоторыми опухолевыми клетками, включая остеосаркому. А и В цепи PDGF могут формировать AA, AB или BB димеры. PDGF находится в большом количестве в тромбах и, предположительно, стимулирует раннюю пролиферацию мезенхимальных клеток при репарации перелома кости. PDGF также стимулирует ангиогенез и активизирует хемотаксис моноцитов и нейтрофилов. PDGF в сыворотке является сильным митогеном (AB и BB цепи) и потенциальным стимулятором пролиферации ОБ *in vitro*.

Другие цитокины

Другие цитокины – низкомолекулярные белковые клеточные регуляторы процессов межклеточных взаимодействий, роста и дифференцировки гемопоэтических клеток и воспалительных реакций. В ремоделировании костной ткани принимают участие следующие цитокины: интерлейкины-1 β (IL-1 β), -4, -6, -10, интерферон γ (IFN- γ), TNF- α , колониестимулирующие факторы. Среди названных цитокинов стимулируют образование и функцию ОК колониестимулирующий фактор, IL-3, -6, -11; TNF- α . В исследованиях было показано, что моноциты, выделенные у пациентов с дефицитом эстрогенов и повышенным риском развития ОП, продуцируют высокий уровень IL-1. Эти данные свидетельствуют о том, что IL-1 вовлечен в механизм развития постменопаузального ОП. Подобно IL-1, продукция TNF- α периферическими мононуклеарными клетками была повышена в крови у женщин с ОП, характеризующимся высоким уровнем костного обмена, и у женщин, недавно подвергшихся овариэктомии. Снижение уровня TNF- α отмечалось *in vivo* в результате лечения эстрогенами. Напротив, костную резорбцию замедляют IL-4, -10, -13, а также IFN- γ .

Костные морфогенетические белки (BMP)

BMP – цитокины, относящиеся к семейству TGF, которые обнаружены в костной ткани. Известно, что они способны индуцировать рост кости, а именно, воздействовать на пролиферацию и дифференцировку четырех типов клеток – ОБ, ОК, хондробластов и хондроцитов. Кроме этого, BMP блокируют миогенез и адипогенез. *In vitro* BMP-2, -3, -4 и -7 способствуют росту ОБ и производных костных клеток. Обработка ОБ BMP в течение 4-х недель вызывает минерализацию матрикса, повышение активности щелочной фосфатазы и концентрации мРНК. Показано, что BMP распределены по коллагеновым волокнам костной ткани, в клетках остеогенного слоя надкостницы; в умеренных количествах они имеются в клетках пластинчатой кости и в избытке присутствует в тканях зуба. BMP экспрессируются в процессе развития не только в костной, но и в других тканях. Например, высокая концентрация BMP-6 выявляется в нервной системе. BMP используют в клинической практике для репарации костей. Название BMP описывает

только одну специфическую функцию, но на самом деле данные белки оказывают на организм ряд других эффектов, а именно: формирование хряща, развитие внутренних органов – морфогенез, пролиферация, апоптоз и дифференцировка клеток.

Костный морфогенетический белок 4 (BMP-4) регулирует пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток, полученных от взрослых и имеющих неонатальное происхождение. Кроме того, BMP-4 индуцирует транскрипцию гена **Dlx5**, кодирующего белок, который, будучи фактором транскрипции, регулирует ОБ-специфичную экспрессию генов ОКН и щелочной фосфатазы, а также процесс минерализации. BMP-4 транзиторно экспрессируется дифференцированными производными костных клеток в процессе регенерации перелома. Он также участвует в дифференцировке симпатических нейронов. Определение BMP-4 также важно для диагностики заболеваний, обусловленных нарушениями в развитии гемопоэтической и нервной систем.

Костный морфогенетический белок 6 (BMP-6) является фактором, индуцирующим остеогенез. Определение BMP-6 важно для пациентов с нарушениями метаболизма костной ткани.

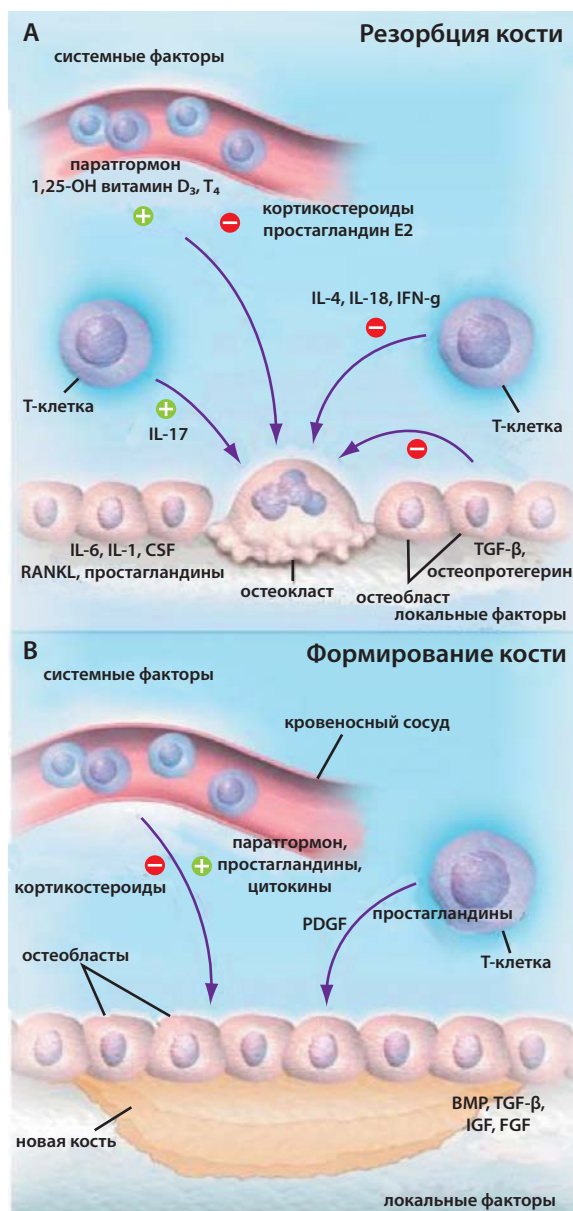
Костный морфогенетический белок 7 (BMP-7) также известен как остеогенный белок-1 и может индуцировать эктопическое образование костной ткани. BMP-7 широко экспрессируется в процессе онтогенеза, играя важную роль в формировании скелетных мышц, нервов, кровеносных сосудов, хрящей и перихондрия.

Молекулы адгезии

Наряду с аутокринными, паракринными и эндокринными сигналами важную роль в остеокласто- и остеобластогенезе играет взаимодействие между клетками и матриксом. Это взаимодействие определяется экспрессирующимися на поверхности клеток специфическими белками – молекулами адгезии, с помощью которых формируются контакты как между костными клетками и матриксом, так и между предшественниками ОК и стромальными/osteобластными клетками. Последнее способствует действию паракринных факторов, регулирующих развитие клеток. Молекулы адгезии принимают участие в миграции предшественников ОБ и ОК из костного мозга, в инициации

и завершении костной резорбции. К молекулам адгезии относятся интегрины, селектины и кадгерины, а также трансмембранные белки, содержащие домены дезинтегрина и металлопротеиназ. Каждый из этих белков распознает свой собственный лиганд. Например, некоторые интегрины распознают специфическую аминокислотную последовательность – RGD, присутствующую в молекулах коллагена, остеопонтина, тромбоспондина, костного сиалопротеина и витронектина.

Регуляция резорбции (рис. А) и формирования кости (рис. В)



Как системные, так и локальные факторы стимулируют образование и активность ОК (рис. А). Системные гормоны, такие как 1,25-(OH)₂ВитаминD₃, PTH и тироксин (Т4) стимулируют образование ОК с помощью экспрессии RANKL на клеточной поверхности незрелых ОБ и их предшественников (стромальных клеток). В дополнение к этому, ОБ продуцируют IL-6 и -1, простагландины, CSFs, которые стимулируют образование ОК. Т-клетки продуцируют IL-4, IL-18, INF-γ, ингибирующие образование ОК.

Как системные, так и локальные факторы могут усиливать пролиферацию и дифференцировку ОБ (рис. В). К ним принадлежат: PTH, простагландины, цитокины и факторы роста, такие как PDGF, продуцируемый лимфоцитами. Костный матрикс является главным источником факторов роста, которые могут усиливать пролиферацию и дифференцировку ОБ. К ним относятся BMPs, TGF-β, IGFs, FGFs. Кортикостероиды могут подавлять активность ОБ и пролиферацию их предшественников.

Регуляция остеокластогенеза

Ampli sRANKL

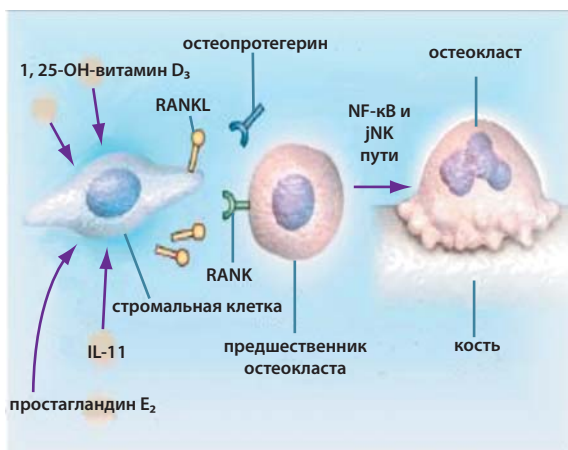
sRANKL – растворимый лиганд RANK и остеопротегерин (OPG) играют ключевую роль в молекулярной регуляции остеокластогенеза. RANKL вырабатывается ОБ и активированными Т-лимфоцитами. Он связывается со специфическим рецептором RANK, который расположен на ОК и дендритных клетках. Увеличение экспрессии RANKL приводит к резорбции костной ткани и, как следствие, к потере костной массы.

Эффект, оказываемый RANKL, может тормозиться остеопротегерином (OPG), который секретируется различными тканями и действует как эндогенный растворимый рецепторный антагонист.

С дисбалансом системы RANKL/OPG связан патогенез различных заболеваний: болезни Педжета, доброкачественных и злокачественных опухолей костной ткани, постменопаузального ОП, ревматоидного артрита, метастазирования в кости, гиперкальциемии. Многочисленные исследования на животных показали, что восстановление баланса RANKL/OPG (например, путем введения OPG) снижает тяжесть этих заболеваний.

В стволовых клетках костного мозга и ОБ мышей RANKL синтезируется первоначально как мембраносвязанный белок, его превращение в растворимую форму происходит под воздействием металлопротеаз. Стимуляторы остеокластогенеза, такие как IL-1 β , -6, -11, -17 и TNF- α усиливают экспрессию RANKL, снижают экспрессию OPG в ОБ и стромальных клетках. Цитокины, ингибирующие остеокластогенез, например, IL-13, IFN- γ и TGF- β 1 оказывают супрессорное действие на экспрессию RANKL и стимулируют выработку OPG.

RANKL и образование ОК



RANKL является стимулирующим фактором в образовании зрелых ОК. Факторы, такие как 1,25(OH) $_2$ витамин D $_3$, PTH, простагландин E $_2$, и IL-1 стимулируют образование ОК с помощью регуляции экспрессии RANKL на клеточной поверхности незрелых ОБ и их предшественников (стромальных клеток). RANKL затем связывается с RANK, находящимся на предшественниках ОК и через активацию ядерного фактора-kB (NF-kB) и Jun N-концевую киназу (JNK) стимулирует дифференцировку и активацию ОК. В дополнение к этому, OPG, «ложный» рецептор RANKL, тормозит связывание RANKL с RANK, тем самым угнетая мобилизацию, пролиферацию и активацию ОК.

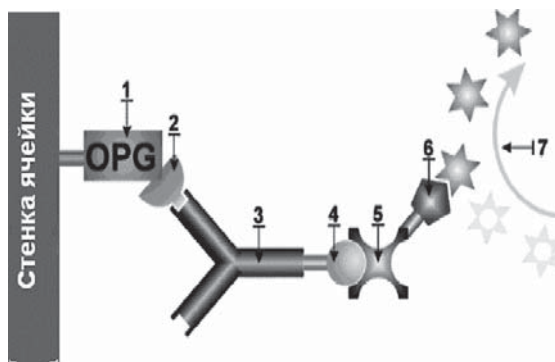
В последнее время множество исследований были направлены на развитие чувствительных ИФА-систем, которые могли бы быть использованы при изучении OPG и RANKL при множественной миеломе, ОП и остеоартрите. Однако до настоящего времени изучение механизмов

функционирования sRANKL было ограничено из-за низкой аналитической чувствительности представленных на рынке наборов, связанной в том числе с деструкцией данной молекулы в патогенезе данных заболеваний

Компания «Biomedica» (Австрия) разработала новый ИФА-набор для определения sRANKL, в котором используется улучшенная система, основанная на NADPH, позволяющая значительно усилить специфический сигнал в образцах сыворотки и плазмы человека по сравнению со стандартными ИФА-наборами.

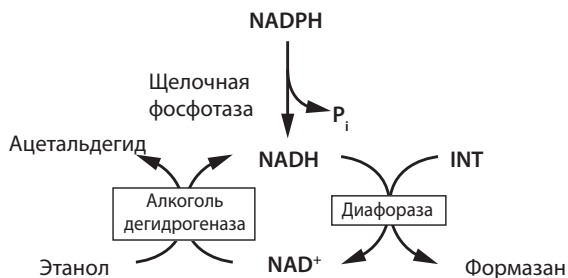
В наборе «Biomedica» щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителом, конвертирует NADPH в NADH, являющийся основным кофактором при амплификации окислительно-восстановительного цикла, в котором происходит превращение NADH в NAD под действием двух ферментов: диафоразы и алкогольдегидрогеназы, в результате которого образуется молекула окрашенного формазана. Данная система позволяет детектировать концентрации аналита в тех образцах, исследование которых ранее было невозможно.

Принцип анализа

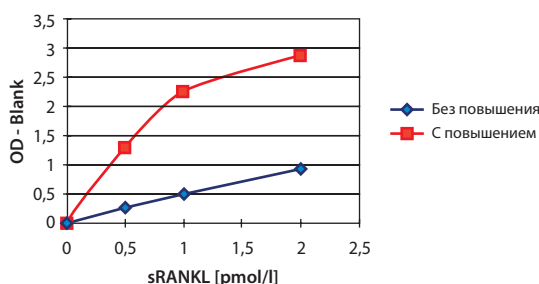


1. Сорбированный OPG
2. Свободный sRANKL
3. Антитела
4. Конъюгат
5. Субстрат
6. Стоп-раствор
7. Изменение окраски

Принцип амплификации

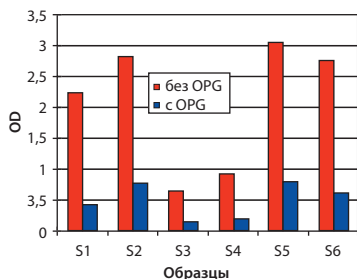


Типичные калибровочные кривые, полученные на наборах для определения RANKL и Ampli sRANKL с и без увеличения чувствительности



Другое преимущество набора – увеличение специфичности за счет добавления OPG в микропланшет. Различия между уровнями RANKL в образцах при добавлении OPG и без его добавления могут отражать остаточное неспецифическое связывание.

Блокировка значений sRANKL при добавлении OPG (6 нмоль/л)



Системные факторы, регулирующие функцию костных клеток

Метаболизм кальция в костной ткани (в процессе роста/ремоделирования) и поддержание

кальциевого гомеостаза в организме – сопряженные процессы. Системные факторы, включая гормоны, такие как ПТГ и 1,25(OH)₂ витамин D₃, кальцитонин, половые гормоны и ретиноиды, вовлечены в гомеостаз кальция. Некоторые местные регуляторы, такие как факторы роста и дифференцировки, цитокины и простагландины, опосредуют системные механизмы.

Главная причина быстрой потери кости – дефицит эстрогенов: в постменопаузе степень снижения уровня эстрадиола в крови достигает 90%. Хорошо известно, что с наступлением менопаузы (или после кастрации у мужчин) наблюдается существенное увеличение скорости ремоделирования костной ткани. Дефицит эстрогенов имеет фундаментальное значение в развитии ранней и поздней форм ОП у женщин в постменопаузе, а также у мужчин пожилого возраста с дефектом эстрогенных рецепторов или нарушением синтеза эстрогенов из тестостерона. Дефицит эстрогенов приводит к повышению числа и активности ОК, вследствие чего возрастает число мест, подлежащих ремоделированию, и создается дисбаланс между активными ОК и ОБ, соответственно, и между процессами резорбции и костеобразования; повышенная резорбция, не компенсируемая адекватным костеобразованием, становится причиной необратимой потери кости. Высокая активность ОК вызывает перфорацию трабекул в месте резорбции, что ведет к нарушениям микроархитектоники кости и снижению ее плотности. В условиях дефицита эстрогенов многие локальные факторы роста, цитокины, медиаторы, действуя через свои рецепторы на ОК и ОБ, могут дополнительно ускорять потерю кости.

ОБ и ОК имеют рецепторы к эстрогенам, т.е. они являются клетками-мишенями для эстрогенов. Клетки-предшественники ОБ и сами ОБ вырабатывают ОК-стимулирующие факторы, в качестве которых могут выступать IL-1 или IL-6. ОК-стимулирующий фактор индуцирует превращение предшественников ОК в зрелые клетки. Активность ОК-стимулирующего фактора ингибируется эстрогенами. ОБ синтезируют также ОК-ингибирующий фактор, активность которого стимулируется эстрогенами. В конечном итоге, эстрогены ингибируют резорбцию костной ткани, связанную с деятельностью ОК. Помимо указанных эффектов, эстрогены подавляют синтез TNF-α,

стимулирующего дифференцировку и активность ОК. У мышей, подвергнутых овариэктомии, наблюдалось увеличение синтеза TNF- α костномозговыми Т-лимфоцитами на фоне повышения костной резорбции. Примечательно, что связанную с овариэктомией потерю костной ткани у мышей можно снизить путем введения растворимых рецепторов TNF- α , блокаторов синтеза TNF- α или растворимого антагониста IL-1. В недавних исследованиях было показано, что эстрогены обладают способностью стимулировать синтез OPG и подавлять синтез RANKL. Однако RANKL и TNF- α активируют передачу сигнала, опосредуемую NF- κ B и Jun в ОК, независимо друг от друга. При этом предполагается, что RANKL необходим для физиологического обновления пула ОК, а TNF- α в основном принимает участие в патологической потере костной ткани на фоне дефицита эстрогенов. Кроме того, было установлено, что эстрогены стимулируют синтез TGF, который может ингибировать костную резорбцию за счет снижения активности ОК и увеличения их апоптоза.

ESTRAMET 2/16 – соотношение метаболитов эстрадиола (2-OHE1/16-OHE1)

Недавние исследования показали, что женщины с преобладанием метаболического пути эстрогенов через 2-гидроксилирование (неактивные метаболиты с антиэстрогенным действием) имеют более низкую минеральную плотность костной ткани (МПК) и положительную семейную историю ОП, что может быть связано с генетическими различиями в метаболизме эстрогенов. Выявлено, что преобладание 2-гидроксиметаболического пути эстрогенов связано с положительным эффектом гормоно-заместительной терапии у женщин с постменопаузальным ОП.

Снижение 2-гидроксилирования было отмечено у женщин с избыточной массой тела без изменения 16-гидроксилирования за счет периферической ароматизации надпочечниковых андрогенов (андростендиона) в эстрон в жировой ткани и снижением концентрации SHBG. Это гиперэстрогенное состояние – фактически один из механизмов защиты от ОП, однако оно повышает риск развития рака молочной железы.

В одном из исследований изучалось защитное действие высокого уровня 2OHE1a в торможении

развития коленного остеоартроза. Предполагают, что оно может осуществляться через путь арахидоновой кислоты, ингибирование синтеза лейкотриенов (даже более сильное ингибирование, чем через синтез тромбоксана и простагландина E2) и модуляцию липоксигеназы, тогда как сам эстрадиол не оказывает никакого влияния на метаболизм арахидоновой кислоты. Метаболиты эстрогена ингибируют 5-липоксигеназу через удаление промежуточных радикалов.

Набор ESTRAMET 2/16 предназначен для количественного определения 2-гидроксиэстрогена (2OHE, 2OHE1a + 2-гидроксиэстрадиола) и 16 α -гидроксиэстрона (16OHE1) в моче.

В патогенезе постменопаузального ОП наряду с дефицитом эстрогенов имеют большое значение изменения в функционировании системы паратгормон-кальцитонин-витамин D₃ (кальцитриол). С возрастом уменьшается превращение в коже провитамина D в холекальциферол и дальнейшая его трансформация в почках и печени в активную форму кальцитриол. Это ведет к нарушению всасывания ионизированного кальция в кишечнике. Секреция паратгормона и кальцитонина зависит от концентрации в крови ионизированного кальция. В постменопаузальном периоде уменьшается всасывание кальция из кишечника, в определенной степени повышается активность паратгормона, снижается уровень кальцитонина, что способствует развитию ОП*.

PTH-родственный пептид (1-34) (PTH-rP)

PTH-rP является фактором, структурно родственном паратгормону. В то время как паратгормон синтезируется только клетками паращитовидной железы, PTH-rP секретируется несколькими типами клеток APUD-системы и неопластическими клонами, а также клетками различных органов плода и взрослого (сосуды, плацента, мозг, лёгкие, сердце, молочная железа). Синтез паратгормона и PTH-rP регулируются витамином D и стероидными гормонами. Их уровень возрастает при гуморальной гиперкальциемии при злокачественных новообразованиях: лимфоме, раке молочной железы, чешуйчатоклеточном раке. Определение PTH-rP применяется в клинике для дифференциального анализа первичного гиперпаратиреозидизма от гипер-

• см. главу «Метаболизм костной ткани» I тома каталога

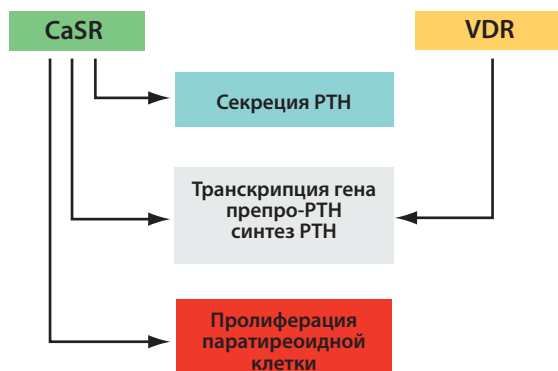
кальциемии, связанной со злокачественными новообразованиями. Тест также применяется при наблюдении за больными с гиперкальциемией, связанной с опухолью.

PTH-rP необходим для роста хондроцитов и задерживает минерализацию хрящей. Большое значение имеет недавно открытый факт, что у животных и человека именно данный пептид обеспечивает трансплацентарный перенос кальция к плоду, захват кальция молочными железами и насыщение им грудного молока. В женском и, особенно, в коровьем молоке этого пептида исключительно много. Возможно, он как-то связан и с сокращениями матки. Интересной особенностью данного биорегулятора служит его способность подавлять пролиферацию эпидермиса, изучаются его потенциальные антипсориазные свойства.

Антитела к кальций-чувствительному рецептору (Anti-CaSR)

CaSR представляет из себя 1078 аминокислотный поверхностный белок, главным образом экспрессирующийся паращитовидными железами и почками. CaSR осуществляет регуляцию секреции PTH, который оказывает влияние на уровень кальция. Отклонения в работе CaSR связаны с гипер- и гипокальциемией. Имеются сообщения об ассоциации пониженной минеральной плотности костной ткани с полиморфизмом различных генов в том числе гена рецептора CASR, необходимых для нормального роста кости.

Функции CaSR



Gc-глобулин или витамин D-связывающий белок (VDP)

Витамин D превращается в печени, а затем в почках в активные метаболиты, перенос которых к тканевым рецепторам витамина D осуществляется Gc-глобулином. Молекула Gc имеет один активный сайт, который связывает D2, D3 и их метаболиты. Он также связывает мономерный актин (G-актин) в эквимолярном соотношении с высоким сродством и тормозит полимеризацию G-актина в F-актин. *In vivo* он действует как основной «сборщик» актина, возможно, защищая организм от повреждения после цитолиза.

В большинстве популяций изменчивость гена Gc выявляется по двум аллелям – *Gc2* и *Gel*. Показано, что при получении с пищей субоптимального количества эргокальциферола (D2) фенотипы Gc коррелируют с наличием или отсутствием рахита, особенно в популяциях с темным цветом кожи. Меланин препятствует проникновению в глубокие слои кожи ультрафиолетовых лучей, поэтому у людей с повышенной пигментацией возник компенсаторный механизм – гиперсекреция сальными железами эргосерина, который под действием ультрафиолетового облучения превращается в витамин D. Затем витамин D проникает вглубь кожи и, достигнув периферических капилляров, связывается с Gc-глобулином и транспортируется в ткани. Показано наличие корреляций между широтой местности, интенсивностью солнечной радиации и частотой аллеля *Gc2*, причем географический показатель в большей степени коррелирует с частотой гетерозигот *Gc2/1*, т.е. в северных широтах гетерозиготы имеют селективные преимущества по сравнению с гомозиготами, по-видимому, за счет их больших адаптивных возможностей по отношению к экстремальным средовым факторам.

Gc-актиновые комплексы обычно повышены в сыворотке беременных женщин и у больных с фульминантным некрозом печени. Повышенный уровень был найден у пациентов с гипофосфатемическим витамин D-резистентным и витамин D-зависимым рахитом, гипопаратиреозидизмом. Понижение уровня Gc-глобулина было обнаружено в образцах сыворотки группы пациентов с высоким риском развития множественного поражения органов, например травмы, сепсиса и др.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



№ по каталогу	Производитель	Наименование, количество / упаковка
AC-11F1	IDS	N-MID остеокальцин, 96
AC-05F1	IDS	Urine Beta CrossLaps (определение С-концевых телопептидов, образующихся при деградации β коллагена I типа в моче), 96
AC-02F1	IDS	Serum CrossLaps (определение С-концевых телопептидов, образующихся при деградации коллагена I типа в сыворотке), 96
AC-04F1	IDS	Alpha CrossLaps (определение С-концевых телопептидов, образующихся при деградации alpha коллагена I типа), 96
8012	BCM Diagnostics	Костный изофермент щелочной фосфатазы (BAP), 96
8003	BCM Diagnostics	Карбокси пропептид проколлагена I типа (CICP), 96
8007	BCM Diagnostics	Дезоксипиридинолин (в моче), 96
8019	BCM Diagnostics	Пиридинолин (в сыворотке), 96
8020	BCM Diagnostics	Хрящевой гликопротеин-39 (YKL-40, HC gp-39), 96
900-151	BCM Diagnostics	DKK-1 (Dickkopf-1), 96
8022	BCM Diagnostics	Спиралевидные участки α-цепи коллагена I типа в моче (Helical Peptide), 96
	BCM Diagnostics	Контроли для кат. номеров 8003-8022
8009	BCM Diagnostics	Креатинин, 96
SB-TR201A	IDS	Тартрат-резистентная кислая фосфатаза (TRAP5b), 96
473-4222	BCM Diagnostics	Костный сиалопротеин, 96
442-0402	Biomedica	Остеопротегерин, 96
BMS2021	Bender Medsystems	Остеопротегерин, 96
442-0422	Biomedica	sRANKL, 96
442-0452	BCM Diagnostics	Ampli sRANKL (детекция - 490 нм) , 96
KAP1461	BCM Diagnostics	Агрекан/Протогликан, 96
AC-10F1	IDS	CartiLaps в моче, 96
194-0802	BioVendor	Олигомерный матриксный белок хряща (COMP), 96
430-8002	Immco	Олигомерный матриксный белок хряща (COMP), 96
7024	BCM Diagnostics	Кальцитонин, 96
KHC1631	BCM Diagnostics	TRAIL, лиганд семейства TNF, индуцирующий апоптоз, 96, 96
BMS2004	BCM Diagnostics	TRAIL, лиганд семейства TNF, индуцирующий апоптоз, 96
414-8880	Axis-Shield	Гомоцистеин, 96
442-0432	Biomedica	Катепсин К, 96
029-001	BCM Diagnostics	Гиалуроновая кислота, 96
DMP100	BCM Diagnostics	Pro-MMP-1, 96
449-8000	DSL	PTH, 96
S-1227	BCM Diagnostics	PTH-родственный пептид (1-34), 96
AC-57F1	IDS	25-ОН-Витамин D, 96
AC-62F1	IDS	1, 25(ОН)2Витамин D (комплект для экстракции включен в набор), 96
900-067	BCM Diagnostics	Циклический AMP, 96
900-013	BCM Diagnostics	Циклический GMP, 96
S-1250	BCM Diagnostics	Остеогенный пептид роста (с экстракцией), 96
406	Bio-Rad	Вопе marker контроль (для мочи), уровни I, II, 2x3x2 мл
K 2314	Immundiagnostik	Витамин D-связывающий белок, 96

МАРКЕРЫ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ

15

№ по каталогу	Производитель	Наименование, количество / упаковка
GAG201	BCM Diagnostics	Сульфатированные гликозаминогликаны (sGAG), 96
455-8400	BCM Diagnostics	Антитела к кальций-чувствительному рецептору, 96
ELH-BMP4-001	BCM Diagnostics	Костный морфогенетический белок 4 (BMP-4), 96
ELH-BMP6-001	BCM Diagnostics	Костный морфогенетический белок 4 (BMP-6), 96
ELH-BMP7-001	BCM Diagnostics	Костный морфогенетический белок 4 (BMP-7), 96