

Strokovni prispevek/Professional article

CITOKINSKI SISTEM OPG/RANKL/RANK PRI LEDVIČNI OSTEODISTROFIJI

OPG/RANKL/RANK CYTOKINE SYSTEM IN RENAL OSTEODYSTROPHY

Ivica Avberšek-Lužnik¹, Breda Pečovnik-Balon², Anton Adamlje³, Igor Rus⁴,
Janja Marc⁵

¹ Enota za laboratorijsko diagnostiko, Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, 4270 Jesenice

² Oddelek za nefrologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

³ Center za dializo, Splošna bolnišnica Trbovlje, Rudarska cesta 9, 1420 Trbovlje

⁴ Center za dializo, Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, 4270 Jesenice

⁵ Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Ledvična osteodistrofija je pogost zaplet pri bolnikih s končno ledvično odpovedjo, ki se zdravijo s hemodializo (HD). Ključni regulatorji kostnega obrata pri ledvični osteodistrofiji, kalcotropni hormoni, delujejo preko sistema OPG/RANKL/RANK. Delovanje tega sistema modulirajo interleukini, kalcitriol in paratiroidni hormon (PTH). Namen naše raziskave je dokazati, da ima ta sistem pomembno vlogo v patogenezi ledvične osteodistrofije in predstavlja enega od mehanizmov delovanja PTH na kostno tkivo.*
- Metode** *V raziskavo smo vključili 106 HD bolnikov (s povprečno starostjo 60 let) in 50 zdravih oseb (s povprečno starostjo 64 let). V serumskih vzorcih bolnikov in kontrolnih oseb smo izmerili koncentracije osteoprotegerina (OPG), liganda receptorja za aktivator jedrnega dejavnika κ B (RANKL), na tartarat rezistentne kisle fosfataze 5b (TRAP 5b), prečnih povezovalcev kolagena (CTX), kostne alkalne fosfataze (BALP), osteokalcina (OC) in PTH. Primerjali smo rezultate meritev pri kontrolni skupini in bolnikih na HD. Ocenili smo povezavo med OPG in RANKL ter kazalci kostnega obrata. Analizirali smo tri najpogostejše polimorfizme v promotorski regiji OPG in ovrednotili njihov vpliv na koncentracije OPG. Za statistično analizo smo uporabili statistični program SPSS za okolje Windows.*
- Rezultati** *Pri bolnikih na HD so približno 3-krat višje serumske koncentracije OPG (0,804 μ g/l) kot pri zdravih oseb (0,272 μ g/l), serumske koncentracije RANKL (1,36 pmol/l) pa 1,66-krat višje (0,82 pmol/l). Serumske koncentracije OPG se pri bolnikih, ki se zdravijo s kalcitriolom, ne razlikujejo značilno ($p = 0,355$), medtem ko so koncentracije RANKL pri bolnikih s terapijo višje ($p = 0,001$) kot pri tistih brez nje. Tudi pri razdelitvi bolnikov na HD v tercile PTH so značilno višje koncentracije OPG v spodnjem, RANKL pa v zgornjem tercilu ($p < 0,001$). OPG ni koreliral s kazalci razgradnje, med kazalci tvorbe pa samo z osteokalcinom. RANKL je v nasprotju z OPG dobro koreliral s PTH, z OC in CTX. Trije polimorfizmi (149 T \rightarrow C, 163 A \rightarrow G, 950 T \rightarrow C) v promotorju gena za OPG ne vplivajo na izražanje gena in s tem posledično na njegove serumske koncentracije.*
- Zaključki** *Naši rezultati so potrdili dokaze študij in vitro o inhibicijskem delovanju PTH na tvorbo OPG in o njegovih stimulatornih učinkih na tvorbo RANKL. Koncentracije OPG so bile najvišje pri bolnikih na HD v prvem, koncentracije RANKL pa v tretjem tercilu PTH. Pri bolnikih na HD z visokim obratom je zaradi učinkov PTH porušeno ravnotežje v sistemu OPG/RANKL/RANK in pospešena razgradnja kostnega tkiva. Rezultati potrjujejo vpletenost citokinskega sistema OPG/RANKL/RANK v patogenezo ledvične osteodistrofije.*

Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Asist. dr. Ivica Avberšek-Lužnik, mag. farm., spec. med. biokem., Enota za laboratorijsko diagnostiko, Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, 4270 Jesenice, e-mail: ivica.avbersekluznik@gmail.com

Ključne besede *osteoprotegerin (OPG); ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika κ B (RANKL); ledvična osteodistrofija*

Abstract

Background *Renal osteodystrophy is one of the most common complications affecting patients with end-stage renal disease treated with hemodialysis (HD). The action of calcitropic hormones in renal osteodystrophy is regulated by the OPG/RANKL/RANK system. Its function is modulated by interleukines, calcitriol and parathyroid hormone (PTH). The aim of our study was to confirm that this system is involved in the pathogenesis of renal osteodystrophy and supports the mechanism of PTH action on bone.*

Methods *106 HD patients (mean age 60 years) and 50 healthy volunteers (mean age 64 years) were enrolled in the study. In serum samples of patients and controls we determined concentrations of OPG, RANKL, tartar resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b), serum C-terminal telopeptide cross-links of type I collagen (CTX), bone specific alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC) and parathyroid hormone (PTH). We compared serum measurements of HD patients and controls and assessed the correlation of OPG and RANKL with bone markers. The most frequent OPG promoter gene polymorphisms were also determined. SPSS 12.1 for Windows was used for statistical analysis.*

Results *Median OPG concentrations were approximately three times higher in HD patients (0.804 μ g/l) than in healthy volunteers (0.272 μ g/l). Mean serum RANKL concentrations were 1.66-fold higher in HD patients (1.36 pmol/l) than in controls (0.82 pmol/l). Serum RANKL levels significantly differed between patients with and without calcitriol therapy ($p = 0.001$). After dividing HD patients into tertiles according to PTH, we observed significantly higher OPG values in the lower and RANKL in the upper tertile ($p < 0.001$). OPG did not correlate with bone resorption markers. Only weak correlation of bone formation markers with osteocalcin was noted. In contrast to OPG, RANKL correlated well with PTH, OC and CTX. OPG promoter gene polymorphisms (149 T \rightarrow C, 163 A \rightarrow G, 950 T \rightarrow C) do not influence OPG expression and consequently its serum levels.*

Conclusions *Our results support the outcomes of in vitro studies of PTH inhibitory action on OPG and PTH stimulatory action on RANKL synthesis. The highest OPG values were observed in the first tertile and RANKL levels in the third PTH tertile. In HD patients with high bone turnover, PTH action leads to disbalance in OPG/RANKL/RANK and consequently to accelerated bone resorption. We proved the role of the OPG/RANKL/RANK system in the pathogenesis of renal osteodystrophy.*

Key words *osteoprotegerin (OPG); receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL); renal osteodystrophy*

Uvod

Ledvična osteodistrofija je pogost zaplet pri bolnikih s končno ledvično odpovedjo, ki se zdravijo s hemodializo in peritonealno dializo. Predstavlja skupno ime za spremembe v kostni remodelaciji pri dializnih bolnikih. Dinamika kostne remodelacije je odvisna od aktivnosti kostnih celic in delovanja lokalnih mediatorjev, npr. citokinov in rastnih dejavnikov, ki uravnavajo komunikacijo med osteoklasti in osteoblasti. Nastajajo v kostnih celicah in celicah hematopoetskega tkiva. Citokini in rastni dejavniki, ki so vpleteni v proces kostne remodelacije, so: IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , TGF 3 in IGF. IL-1 in TNF- α pospešujeta proliferacijo in diferenciacijo predhodnikov osteoklastov, IL-6 in IL-11 pa diferenciacijo dozorevajočih osteoklastov. TNF- α vpliva na razgradnjo kosti s pospeševanjem tvorbe IL-6, na tvorbo IL-6 pa deluje tudi PTH.¹⁻³ Montalban, Haughers in sodelavci^{4,5} so odkrili zvišano eks-

presijo IL-1, TNF- α , IL-6 in njihovih receptorjev pri kronični ledvični odpovedi. Ti dokazi potrjujejo pomembno vlogo naštetih citokinov v patogenezi ledvične osteodistrofije.

Študija Coena in sodelavcev⁶ kaže na vse večjo vlogo sistema OPG/RANKL/RANK v procesu osteoklastogeneze. Osteoprotegerin (OPG) in ligand receptorja za aktivator jedrnega dejavnika κ B (RANKL) sta proteina osteoblastov, receptor za aktivator jedrnega dejavnika κ B (RANK) pa protein v osteoklastih. OPG predstavlja topni receptor za RANKL. Blokira interakcijo RANKL z RANK in tako zavira diferenciacijo osteoklastov in napredujočo razgradnjo kostnega tkiva. Novejše razlage patogenetskih mehanizmov nastanka ledvične osteodistrofije se nagibajo k možnosti, da ključni regulatorji kostnega obrata pri tej bolezni, npr. kalcotropni hormoni, delujejo preko sistema OPG/RANKL/RANK.

Dokazano je, da delovanje sistema OPG/RANKL/RANK modulirata poleg interleukinov tudi paratiroidni hormon (PTH) in kalcitriol. Mehanizmi delovanja naštetih molekul niso razjasnjeni. Ker tvorbo OPG zavirata PTH in kalcitriol, je velika verjetnost, da so spremembe v ravnotežju sistema OPG/RANKL/RANK glavni vzrok za spremembe v kostni remodelaciji pri ledvični osteodistrofiji in pri drugih kostnih boleznih.⁷⁻⁹

Namen naše raziskave je dokazati, da ima sistem citokinov OPG/RANKL/RANK pomembno vlogo v patogenezi ledvične osteodistrofije in predstavlja enega od mehanizmov delovanja PTH na kostno tkivo. *In vitro* študije na celičnih kulturah so namreč pokazale, da delovanje sistema OPG/RANKL/RANK modulira PTH, ki pospešuje tvorbo RANKL in zmanjšuje tvorbo OPG.

Preiskovanci in metode

Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 106 dializnih bolnikov (s povprečno starostjo 60 let) in 50 zdravih oseb (s povprečno starostjo 64 let). Dializni bolniki so bili iz treh slovenskih centrov za dializo: Jesenice (35), Trbovlje (31) in Maribor (40). S postopki hemodialize se je zdravil 101 bolnik, z ambulantno peritonealno dializo pa 5 bolnikov. Povprečno trajanje dialize je bilo 57,8 meseca.

Vzroki za končno ledvično odpoved pri hemodializnih (HD) bolnikih so bili različni: kronični glomerulonefritis, hipertenzivna nefroskleroza, kronični pielonefritis, analgetska nefropatija, policistična degeneracija ledvic in diabetična nefropatija.

Bolniki so bili dializirani 3-krat tedensko, fosfatne vezalce je prejelo 98 bolnikov v odmerkih, ki so bili individualno odrejeni (kalcijev karbonat je prejelo 65 bolnikov, aluminijev hidroksid 13 bolnikov, oba navedena vezalca 14 bolnikov, sevelamer hidroklorid 6 bolnikov). Vitamin D terapijo (Rocaltrol, Calcijex, D3 granulat) je prejelo 26 bolnikov v intravenskih odmerkih od 0,25 do 1 µg/dan po dializi. Preostala ledvična funkcija je bila ohranjena pri 32 bolnikih in je znašala v povprečju $0,05 \pm 0,03$ ml/s/1,73 m².

Vsi preiskovanci so podpisali obrazec za prostovoljno vključitev v raziskavo. Pridobili smo tudi dovoljenje Komisije za medicinsko etična vprašanja Slovenije. V Razpredelnici 1 so zbrane osnovne značilnosti preiskovancev.

Vzorci seruma in plazme

Zaradi cirkadianih ritmov izločanja večine biokemičnih kazalcev smo venski odvzem krvi izvršili med 6. in 9. uro zjutraj pred dializo. Polno kri, odvzeto z antiokoagulantom (K3EDTA), in vzorce serumov smo do analize zamrznili na -70 °C.

Vzorci krvi in izolacija DNK

DNK so osamili iz levkocitov venske krvi v laboratoriju Katedre za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo. Vzorci krvi so bili odvzeti z antiokoagulantom

(K3EDTA). Osamitev DNK je potekala s postopkom izsoljevanja.¹⁰

Merjenje biokemijskih kazalcev

V biokemičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Jesenice smo z imunokemijskimi metodami izmerili koncentracije sledečih kazalcev kostne presnove: OPG, RANKL, na tartarat odporne kisle fosfataze 5b (TRAP 5b), prečnih povezovalcev kolagena (CTX), kostne alkalne fosfataze (BALP), osteokalcina (OC) in PTH.

Statistična analiza

Rezultate smo izrazili kot povprečno vrednost s standardno deviacijo ($\bar{x} \pm SD$) in kot mediano z območjem (min - max vrednost) pri parametrih, katerih porazdelitev ni bila normalna. Porazdelitev rezultatov posameznega biokemičnega kazalca smo testirali s Kolmogorov-Smirnovim testom. Za celovito statistično obdelavo smo uporabili naslednje teste: Oneway ANOVA, Kruskal-Wallisov test in Spearmanovo korelacijo. Meja statistične značilnosti je bila pod 0,05. Uporabili smo statistični program SPSS 12.1 za okolje Windows (SPSS, Inc. Chicago, USA).

Rezultati

OPG in RANKL ter serumski kazalci kostnega obrata pri bolnikih na HD

Serumske kazalce kostnega obrata (OPG, RANKL, TRAP 5b, CTX, BALP, OC in PTH) smo izmerili pri 50 zdravih oseb in 106 bolnikih na HD. Osnovne značilnosti preiskovancev smo prikazali v Razpr. 1 in 2. Zaradi vpliva kalcitriola in PTH na tvorbo OPG in RANKL smo bolnike na HD razdelili v podskupini s terapijo s kalcitriolom in brez. Za ocenjevanje sprememb v kostni presnovi zdravniki še vedno najpogosteje uporabljajo plazemske koncentracije PTH,

Razpr. 1. Osnovne značilnosti preiskovancev, zdravih oseb in HD bolnikov z in brez terapije s kalcitriolom.

Table 1. General characteristics of patients, controls and HD patients without and with calcitriol therapy.

	Kontrolne osebe Controls	Podskupina I (brez terapije) Subgroup I (without therapy)	Podskupina II (s terapijo) Subgroup II (with therapy)
N	50	80	26
Moški: N (%) Males	26 (52,0)	38 (47,5)	16 (61,5)
Ženske: N (%) Females	24 (48,0)	42 (52,5)	10 (38,5)
Starost (leta) Age (years)	62 ± 17,1	59,7 ± 13,3	60,1 ± 12,9
HD (meseci) HD (months)	-	35 (6-240)	42,5 (4-384)
Fosfati (mmol/l) Phosphates	1,22 ± 0,16	1,66 ± 0,39	1,72 ± 0,35
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,34 ± 0,13	2,39 ± 0,24	2,34 ± 0,14
CaXP (mmol ² /l ²)	2,85 ± 0,15	3,96 ± 0,31	4,02 ± 0,21
Diureza (ml) Diuresis	-	295 ± 240	240 ± 92

Razpr. 2. Osnovne značilnosti preiskovancev v terci-
lih PTH.

Table 2. General characteristics of patients in PTH ter-
tiles.

	I. tercil PTH I	II. tercil PTH II	III. tercil PTH III	p
N	26	27	27	
Moški: N (%) Males	14 (17,5)	13 (16,3)	11 (13,7)	0,048
Ženske: N (%) Females	12 (15,0)	14 (17,5)	16 (20,0)	0,033
Starost (leta) Age (years)	65,3 ± 13,2	56,9 ± 12,8	57,2 ± 12,6	0,039
HD (meseci) HD (months)	28 (6–231)	35 (6–185)	46 (3 – 240)	0,446
Fosfati (mmol/l) Phosphate	1,59 ± 0,33	1,57 ± 0,40	1,82 ± 0,42	0,083
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,41 ± 0,30	2,40 ± 0,24	2,38 ± 0,19	0,325
CaXP mmol ² /l ²	3,83 ± 0,32	3,76 ± 0,32	4,33 ± 0,31	0,079
PTH (µg/l)	29,3–103,0	109,7–263,0	362,0–1700,0	<0,001
Diureza (ml) Diuresis	270 ± 225	253 ± 245	362 ± 187	0,611

zato smo se odločili, da bolnike na HD brez zdravljenja z vitaminom D razdelimo v tercične skupine po vrednosti PTH (Razpr. 2). Tako smo zagotovili enotno porazdelitev bolnikov na znotraj tercičnih skupin, izognili pa smo se delitvi glede na koncentracije PTH, ki so jih, danes pa redkeje, uporabljali za delitev ledvične osteodistrofije v različne podtippe. Rezultati meritve biokemičnih parametrov pri kontrolni skupini in bolnikih na HD so podani v Razpr. 3. Mediana serumske koncentracije OPG je pri HD bolnikih 2,96-krat višja kot pri kontrolni skupini. Tudi povprečna vrednost serumske koncentracije RANKL je pri bolnikih na HD višja kot pri kontrolni skupini (1,66-krat). Pri bolnikih na HD so poleg OPG in RANKL značilno višje tudi koncentracije kazalcev tvorbe (BALP, OC) in kazalcev razgradnje (TRAP 5b, CTX), kar neodvisno potrjuje visok kostni obrat pri bolnikih na HD.

Pri bolnikih na HD, ki prejemajo kalcitriol, smo dokazali značilno višje vrednosti RANKL, vrednosti OPG in ostalih kazalcev pa niso bile značilno višje (Razpr. 4).

Zelo zanimivo, teoretično pričakovano in statistično značilno ($p < 0,001$) so se gibale koncentracije OPG in RANKL v PTH tercičnih skupinah (Razpr. 5). Koncentracije OPG so bile v prvem tercilu višje kot v tretjem, RANKL pa obratno (Sl. 1 in 2), kar kaže na učinke PTH, ki zavira tvorbo OPG, tvorbo RANKL pa pospešuje.

Razpr. 5. Serumske koncentracije OPG, RANKL ter
kostnih kazalcev v tercičnih PTH.

Table 5. OPG, RANKL and bone markers in PTH tertiles.

	PTH I 26	PTH II 27	PTH III 27	p
RANKL (pmol/L)	1,23 ± 0,26	1,27 ± 0,42	1,54 ± 0,39	<0,001
OPG (µg/L)	0,960 (0,498–3,144)	0,744 (0,360–1,884)	0,792 (0,342–1,62)	<0,001
BALP (µkat/L)	0,40 (0,13–1,54)	0,49 (0,22–0,98)	0,76 (0,16–2,98)	<0,001
OC (µg/L)	11,1 (1,0–81,0)	18,8 (5,5–73,4)	59,8 (9,4–195,8)	<0,001
TRAP 5b (U/L)	3,73 ± 1,00	3,83 ± 1,17	4,56 ± 1,67	<0,001
CTX (µg/L)	1,33 (0,43–3,27)	1,75 (0,51–3,27)	3,1 (0,78–6,85)	<0,001

Razpr. 3. Serumske koncentracije OPG, RANKL in kost-
nih kazalcev pri bolnikih na HD in kontrolnih ose-
bah.

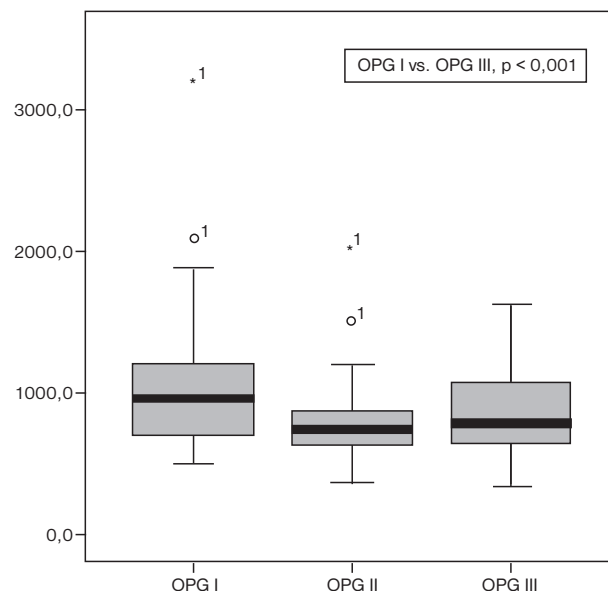
Table 3. OPG, RANKL and bone markers in HD pa-
tients and controls.

Parameter	HD bolniki HD patients N = 80	Kontrolne osebe Controls N = 50	p
RANKL (pmol/L)	1,36 ± 0,39	0,82 ± 0,70	<0,001
OPG (µg/L)	0,804 (0,342–3,144)	0,272 (0,109–0,552)	<0,001
PTH (pmol/L)	18,6 (3,1–310,2)	3,9 (2,1–7,2)	<0,001
CTX (µg/L)	1,79 (0,43–6,85)	0,34 (0,22–0,46)	<0,001
TRAP-5b (U/L)	4,04 ± 1,35	2,98 ± 0,89	<0,001
bALP (mkat/L)	0,51 (0,13–2,98)	0,37 (0,18–0,57)	<0,001
OC (µg/L)	18,6 (1,0–195,8)	7,6 (2,2–11,1)	<0,001

Razpr. 4. Serumske koncentracije OPG in RANKL pri
dializnih bolnikih s terapijo z vitaminom D in brez.

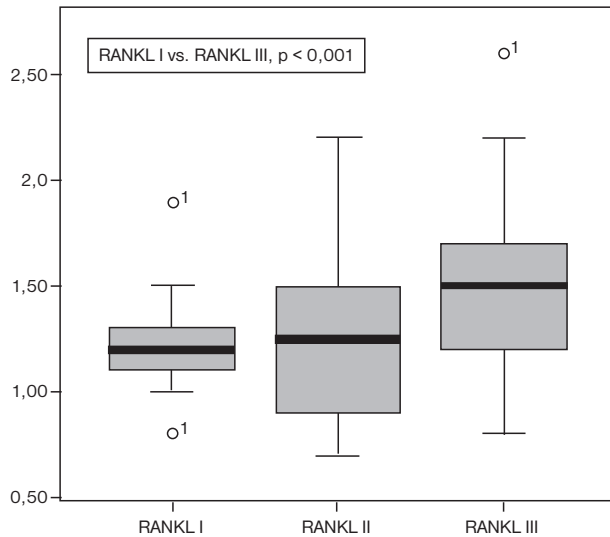
Table 4. OPG and RANKL in dialysis patients with and
without calcitriol therapy.

Parameter	Bolniki s terapijo Patients with therapy n = 26	Bolniki brez terapije Patients without therapy n = 80	p
OPG (µg/L)	0,831 (0,534–2,196)	0,804 (0,342–3,144)	0,355
RANKL (pmol/L)	1,65 ± 0,44	1,36 ± 0,39	0,001
PTH (pmol/L)	24,5 (4,1–226,4)	18,6 (23,1–310,2)	0,088
TRAP 5b (U/L)	4,36 ± 1,74	4,04 ± 1,35	0,697
CTX (µg/L)	1,97 (0,87–6,33)	1,79 (0,43–6,85)	0,355
BALP (U/L)	0,60 (0,21–3,76)	0,51 (0,13–2,98)	0,147
OC (µg/L)	27,0 (7,3–294,8)	18,6 (1,0–294,8)	0,072



Sl. 1. Serumske koncentracije OPG v tercičnih PTH.

Figure 1. Serum OPG in PTH tertiles.



Sl. 2. Serumske koncentracije RANKL v tercilih PTH.
Figure 2. Serum RANKL in PTH tertiles.

Korelacijske študije

V nadaljevanju študije smo želeli oceniti povezavo med OPG in RANKL ter ostalimi biokemijskimi kazalci kostnega obrata (Razpr. 6). Več avtorjev^{11, 12} je dokazalo negativno korelacijo med OPG in PTH. Pri naših bolnikih je ta povezava negativna in neznačilna. Spearmanova korelacija ne kaže tesnih povezav med OPG in kazalci tvorbe oz. razgradnje. Tudi RANKL slabo korelira z merjenimi parametri. RANKL v nasprotju z OPG dobro korelira s PTH ($r = 0,322$), z OC ($r = 0,231$) in s CTx ($r = 0,232$).

Vpliv polimorfizmov v genu za OPG na njegove serumske koncentracije

Spremembe v promotorju gena za OPG bi lahko vplivale na vezavo različnih transkripcijskih dejavnikov in spremenile izražanje OPG in posledično tudi njegove serumske koncentracije ter učinke v kostnem mikrookolju. Z analizo polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) smo določili polimorfizme (149 T → C, 163 A → G, 950 T → C) v promotorju gena za OPG (Razpr. 7). Za nobenega od preučevanih polimorfizmov ni statistično značilne povezave s serumskimi koncentracijami OPG.

Razpr. 7. Serumske koncentracije OPG pri dializnih bolnikih za polimorfizme 149T > C, 163A > G in 950T > C na genu za OPG.

Table 7. Serum OPG and OPG polymorphisms 149T > C, 163A > G and 950T > C.

Polimorfizem Polymorphism	Genotip Genotype	Frekvenca (%) Frequency	OPG (µg/l)	P
149T > C	TT	94,1	0,807 (0,320–1,884)	0,622
	TC	5,9	0,850 (0,334–2,028)	
	CC	0	/	
163A > G	AA	78,6	0,725 (0,411–1,790)	0,705
	AG	20,1	0,813 (0,420–2,140)	
	GG	1,3	0,792	
950T > C	TT	30,1	0,760 (0,512–1,282)	0,901
	TC	45,2	0,827 (0,344–1,884)	
	CC	24,7	0,790 (0,460–1,506)	

Razpravljanje

Naši rezultati se ujemajo z dokazi Haasa,¹¹ ki je dobil značilno nižje serumske koncentracije OPG pri bolnikih na HD z visokim kostnim obratom v primerjavi s tistimi, ki so imeli nizek kostni obrat. Haas je svoje izsledke podprl z rezultati kostne histomorfometrije, ki kažejo na nižjo stopnjo mineralizacije in hkrati na visoko aktivnost osteoklastov in osteoblastov pri bolnikih na HD s PTH nad 47,6 pmo/l. Pri teh bolnikih so bile koncentracije značilno nižje kot pri bolnikih s PTH pod 47,6 pmol/l. Kombinacijo PTH in OPG je priporočal kot uporabno pri napovedovanju ledvične osteodistrofije z visokim kostnim obratom. Do enakih zaključkov je leta 2005 prišla tudi naša skupina,¹² nasprotno pa je Coen¹³ dokazal rahlo, vendar neznačilno višje koncentracije OPG v serumu bolnikov z visokim kostnim obratom, zato obstaja dvom o diagnostični uporabnosti OPG pri napovedovanju kostnega obrata pri bolnikih na HD. Potrebne so načrtovane študije o diagnostični uporabnosti OPG.

In vitro študije so že potrdile vlogo OPG pri negativnem uravnavanju razgradnje kostnega tkiva. O zvišanih serumskih koncentracijah OPG pri bolnikih z ledvično osteodistrofijo so poročali Haas¹¹ in Kazama¹⁴ marca 2002, Coen¹³ junija 2002 ter oktobra 2002 in marca 2005 naša skupina.^{12, 15} Avtorji enotno ocenjujejo, da so zvišane koncentracije OPG pri bolnikih na HD posledica učinkov PTH, ki ne pospešuje samo razgradnje kosti, temveč tudi mineralizacijo kosti z večanjem števila osteoblastov, v katerih poteka tvorba OPG. Nasprotno pa študije na genski ravni kažejo, da

Razpr. 6. Korelacijski koeficienti testiranja povezav med OPG in kazalci kostnega obrata pri dializnih bolnikih.

Table 6. Correlation studies between OPG and markers of bone turnover in dialysis patients.

	OPG	RANKL	PTH	bALP	OC	TRAP	CTX
OPG	-	0,031	-0,118	0,024	-0,359*	-0,092	-0,112
RANKL	0,031	-	0,322**	0,174	0,231*	0,048	0,232*
PTH	-0,118	0,322**	-	0,474**	0,670**	0,361**	0,559**
bALP	0,024	-0,075	0,474**	-	0,544**	0,640**	0,590**
OC	-0,359**	0,231*	0,670**	0,544**	-	0,441**	0,743**
TRAP	-0,092	-0,048	0,361**	0,640**	0,441**	-	0,546**
CTX	-0,112	0,232*	0,559**	0,590**	0,743**	0,546**	-

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

PTH zavira ekspresijo gena za OPG in posledično tvorbo OPG. To pomeni, da bi pri dializnih bolnikih z visokim kostnim obratom dejansko lahko pričakovali nižje vrednosti OPG kot pri tistih z nizkim obratom. To je eden od razlogov, da smo v študiji preiskovance razdelili v tercile glede na koncentracije PTH.

Zvišana koncentracija OPG v obtoku je lahko posledica kopičenja zaradi motenega izločanja preko ledvic, kar potrjuje normaliziranje serumskih koncentracij OPG pri ledvičnih bolnikih po uspešni presaditvi ledvic.¹⁶ Sedemindvajset naših preiskovancev (5 v prvem, 8 v drugem in 14 v tretjem tercilu) je imelo še delno ohranjeno ledvično funkcijo. Primerjava diurez pri preiskovancih med terciili ni pokazala značilnih razlik, kljub temu pa so se serumske koncentracije OPG in RANKL značilno razlikovale, zato menimo, da kopičenje teh proteinov v obtoku ni posledica motenega izločanja. Višje vrednosti OPG si razlagamo kot posledico kompenzacijskega odgovora organizma na porušeno homeostazo kalcotropnih hormonov (PTH, kalcitriol). Kalcotropni hormoni modularajo delovanje sistema OPG/RANK/RANKL ter stimulirajo aktivnost osteoklastov in osteoblastov na celični in molekularni ravni. To delovanje potrjujejo tudi značilno višje koncentracije kazalcev tvorbe in razgradnje.

Rezultati naše študije so pokazali, da so pri bolnikih na HD približno 3-krat višje serumske koncentracije OPG (0,804 µg/L) kot pri zdravih osebah (0,272 µg/L), serumske koncentracije RANKL (1,36 pmol/l) pa 1,66-krat višje (0,82 pmol/l). Serumske koncentracije OPG se pri bolnikih, ki prejemajo kalcitriol, ne razlikujejo značilno ($p = 0,355$), medtem ko so koncentracije RANKL pri bolnikih s terapijo višje ($p = 0,001$) kot pri tistih brez nje. Tudi pri razdelitvi bolnikov na HD v PTH tercile so značilno višje koncentracije OPG v spodnjem tercilu, RANKL pa v zgornjem tercilu ($p < 0,001$).

In vitro študije so potrdile zaviralne učinke PTH in kalcitriola na tvorbo OPG oz. njuno stimulacijsko delovanje na tvorbo RANKL. Zaradi teh vplivov je lahko porušeno ravnotežje v sistemu OPG/RANK/RANKL, pospešena osteoklastogeneza in razgradnja kostnega tkiva. V celoti pa ne moremo izključiti možnosti, da je zvišan OPG v obtoku posledica nastajanja v drugih organih. Več avtorjev^{17,18} je namreč dokazalo, da tvorba OPG poteka tudi v celicah pljuč, srca, žilja in ledvic, zvišuje se pri vnetjih in s starostjo.

Več raziskovalcev je dokazalo, da zdravljenje z vitaminom D vpliva na izražanje oziroma tvorbo OPG in RANKL. Serumske koncentracije vitamina D se znižajo v zgodnji fazi razvoja ledvične odpovedi. Krajši čas je izraženo kompenzacijsko delovanje PTH, ki pospešuje tvorbo kalcitriola. Ko delovanje PTH odpove, nastopi čas za uvedbo zdravljenja s kalcitriolom, ki je povezano s strogim nadzorom nad pojavom hiperkalcemije in razvojem adinamične kostne bolezni. Kalcitriol pospešuje izražanje RANKL v dozorevajočih preosteoblastih in izražanje OPG v zrelih osteoblastih.^{19,20} Zvišan RANKL pri bolnikih na HD z zdravljenjem ni le posledica delovanja PTH, ampak dodatnih učinkov kalcitriola, ki vpliva na nastajanje preosteoblastov in na sorazmerno večjo tvorbo RANKL. Ker kalcitriol pospešuje tudi dozorevanje osteoblastov, po-

sredno vpliva tudi na tvorbo OPG, ki je pri bolnikih, ki prejemajo kalcitriol, višji kot pri bolnikih brez terapije.

Korelacijske študije OPG in RANKL z biokemičnimi kazalci kostne presnove pri bolnikih na HD so redke.^{11,12} Ugotavljajo negativno korelacijo med OPG in PTH. Tudi pri naših bolnikih je ta povezava negativna in neznačilna. OPG ni koreliral s kazalci razgradnje, med kazalci tvorbe pa samo z osteokalcinom. Serumske koncentracije OPG verjetno ne odsevajo stanja v kostnem mikrookolju. Ta razlaga je podprta z dejstvom, da OPG nastaja v različnih tkivih (pljuča, srce, kosti, ledvica, žile), zato lahko sproščanje iz naštetih organov prispeva k zvišanju koncentracij OPG v obtoku. Tudi RANKL je slabo koreliral z merjenimi parametri, v nasprotju z OPG pa dobro s PTH, z osteokalcinom in s CTx. Ti rezultati kažejo na to, da ima RANKL večjo možnost kot potencialni kazalec kostnega obrata pri bolnikih na HD.

V več študijah so dokazali, da imajo bolniki s kronično ledvično odpovedjo zvišane serumske koncentracije OPG.^{11,12} Skupaj z raziskovalno skupino Arko Barbare²¹ smo dokazali, da trije polimorfizmi (149 T → C, 163 A → G, 950 T → C) v promotorju gena za OPG ne vplivajo na izražanje gena in s tem posledično na njegove serumske koncentracije.

Naši rezultati so potrdili dokaze *in vitro* študij o inhibicijskem delovanju PTH na tvorbo OPG in o njegovih stimulacijskih učinkih na tvorbo RANKL. Koncentracije OPG so bile najvišje pri bolnikih na HD v prvem, koncentracije RANKL pa v tretjem tercilu PTH. Pri bolnikih na HD z visokim obratom je zaradi učinkov PTH porušeno ravnotežje v sistemu OPG/RANKL/RANK in pospešena razgradnja kostnega tkiva. Rezultati potrjujejo vpletenost citokinskega sistema OPG/RANKL/RANK v patogenezo ledvične osteodistrofije.

Literatura

1. Hruska K. New concepts in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2755-60.
2. Dithabanchong S, Gonzales EA. Regulation of bone cell development and function: implications for renal osteodystrophy. *J Investig Med* 2001; 49: 240-9.
3. Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H. Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal bone disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 759-68.
4. Montalban C, Garcia-Unzueta MT, De Francisco AL, Amado JA. Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: Relationship with serum PTH and bone remodeling markers. *Horm Metab Res* 1999; 31: 14-7.
5. Haughes FJ, Howells GL. Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone Miner* 1993; 21: 28-8.
6. Coen G, Ballanti P, Calabria S, Fischer MS, Liferi F, Di Zazzo G, et al. Osteoprotegerin / osteoprotegerin - ligand (OPG/OPGL) system in renal osteodystrophy (RO). *JN* 2002; 15: 725-40.
7. Gonzales EA. The role of cytokines in skeletal remodelling: possible consequence for renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 945-50.
8. Morony S, Capparelli C, Lee R, Shimamoto G, Boone T, Lacey DL, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 beta, TNF-alpha, PTH, PTHrP, and 1.25(OH)2D3. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1478-85.
9. Martin KJ, Olgaard K, Coburn JW. Diagnosis, assessment and treatment of bone turnover abnormalities in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 558-65.

10. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky N, White TJ. PCR protocol: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990.
11. Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, Kletzmayer J, Schwarz C, Dömer Zsontsich T, et al. Osteoprotegerin and parathyroid hormone as markers of high turnover osteodystrophy and decreased bone mineralization in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 580–6.
12. Avberšek-Lužnik I, Pečovnik-Balon B, Rus I, Marc J. Increased bone resorption in HD patients: is it caused by elevated RANKL synthesis? *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 566–70.
13. Coen G, Ballanti P, Balducci A, Calabria S, Fischer MS, Jankovic L, et al. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 233–8.
14. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, Tsuda E, Miura M, Iwasaki Y, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 525–32.
15. Avberšek-Lužnik I, Malešič I, Rus I, Marc J. Increased levels of osteoprotegerin in hemodialysis patients. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1019–23.
16. Kazama JJ, Shigematsu T, Yano K, Tsuda E, Miura M, Iwasaki Y, et al. Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 525–32.
17. Malyszko J, Malyszko JS, Wolczynski S, Mysliwiec M. Osteoprotegerin and its Correlations with new markers of bone formation and bone resorption in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35: 2227–9.
18. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309–19.
19. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelly MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165–76.
20. Hruska KA, Saab G, Chaudhary LR, Quinn CO, Lund RJ, Surendran K. Kidney-bone, bone-kidney, and cell-cell communications in renal osteodystrophy. *Seminars in Nephrology* 2004; 24: 25–38.
21. Arko B, Avberšek-Lužnik I, Marc J. Vpliv polimorfizmov v promotorju gena za OPG na njegovo serumsko koncentracijo pri dializnih bolnikih. *Farm Vestn* 2004; 55: 322–4.

Prispelo 2007-03-29, sprejeto 2007-07-16