

## The role of TNF- $\alpha$ and IL-17A in postmenopausal osteoporosis

Behrouzi AR<sup>1\*</sup>, Hadi HA<sup>1</sup>, Ghandi AR<sup>1</sup>, Mosayebi G<sup>2</sup>

1- Department of Orthopedic Surgery, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Assistant professor of immunology, School of Medicine and Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 27 Oct 2013, Accepted: 18 Dec 2013

### Abstract

**Background:** Osteoporosis is characterized by low bone density and loss of structural integrity which can increase the risk of bone fracture and its side effects. In the recent studies, new evidences of the relationship between immune system such as TNF- $\alpha$  and IL-17A and bone destruction have been obtained. The aim of present study was to investigate serum level of TNF- $\alpha$  and IL-17A in women with postmenopausal osteoporosis.

**Material & Methods:** In this analytical study 40 women with postmenopausal osteoporosis and 10 healthy women were enrolled to the study based on inclusion and exclusion criteria. The serum level of TNF- $\alpha$  and IL-17A were measured by ELISA method and compared between groups.

**Results:** The mean serum level of TNF- $\alpha$  in case and control group was  $957.7 \pm 489.01$  and  $418.09 \pm 176.7$  pg/ml respectively which was significantly more in case group ( $p = 0.001$ ). The mean serum level of IL-17A in case and control group was  $95.23 \pm 36.7$  and  $125.7 \pm 30.6$  respectively which was significantly less in case group ( $p = 0.019$ ).

**Conclusion:** The serum level of TNF- $\alpha$  in women with postmenopausal osteoporosis was more than healthy women which mention to the role of TNF- $\alpha$  in pathogenesis of osteoporosis and potential therapeutic role of anti TNF- $\alpha$  agents but because of unclear role of IL-17A in pathogenesis of osteoporosis, we can not explain its mechanism in pathogenesis of osteoporosis, so, more studies with regard to role of IL-17A in bone metabolism are required.

**Keywords:** Cytokines, Interleukin-17A, Osteoporosis, Tumor Necrosis Factor alpha

\* Corresponding author:

Address: Department of orthopedic surgery, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Email: behrouzi\_ahmadreza@yahoo.com

## نقش فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین 17 در استئوپروز پس از یائسگی

احمد رضا بهروزی<sup>1\*</sup>، حسینعلی هادی<sup>1</sup>، احمد رضا قندی<sup>1</sup>، قاسم مسیبی<sup>2</sup>

1- استادیار، گروه ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران  
2- استاد، گروه میکروبی شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 92/8/5 تاریخ پذیرش: 92/9/27

### چکیده

**زمینه و هدف:** استئوپروز دانسیته استخوانی پایین و از دست رفتن پیوستگی بافت استخوانی می‌باشد که سبب افزایش خطر شکستگی‌های استخوانی و عوارض ناشی از آن می‌شود. در مطالعات اخیر شواهدی از ارتباط بین سیستم ایمنی از جمله فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین 17 و تخریب استخوانی به دست آمده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی سطح سرمی این دو فاکتور التهابی در بیماران مبتلا به استئوپروز طراحی و اجرا شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تحلیلی 40 زن یائسه مبتلا به استئوپروز و 10 زن سالم از نظر استئوپروز با توجه به معیارهای ورود و خروج وارد مطالعه شده و ارزیابی شدند. سطح سرمی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و اینترلوکین 17 افراد شرکت کننده با استفاده از روش الیزا اندازه‌گیری و بین دو گروه بیمار و سالم مقایسه گردید.

**یافته‌ها:** میانگین سطح سرمی فاکتور نکروز دهنده در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $489/01 \pm 957/7$  و  $176/7 \pm 418/09$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود که در گروه مورد به صورت معنی‌داری بیشتر بود ( $p=0/001$ ). میانگین سطح سرمی اینترلوکین 17 در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $36/7 \pm 95/23$  و  $125/7 \pm 30/6$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود که در گروه مورد به صورت معنی‌داری کمتر بود ( $p=0/019$ ).

**نتیجه‌گیری:** سطح سرمی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در زنان مبتلا به استئوپروز به صورت معنی‌داری بیش از زنان سالم بود که نشان‌دهنده نقش آن در بروز بیماری و نقش احتمالی مهارکننده‌های این فاکتور در پیش‌گیری و درمان استئوپروز می‌باشد ولی با توجه به داده‌های اندک درباره نقش اینترلوکین 17 در بروز استئوپروز نمی‌توان مکانیسم بروز بیماری را به روشنی توضیح داد از این رو انجام مطالعات بیشتر با هدف بررسی اینترلوکین 17 و نقش آن در متابولیسم استخوانی لازم به نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** سیتوکاین، اینترلوکین 17، استئوپروز، فاکتور نکروز توموری آلفا

\* نویسنده مسئول: اراک، میدان ولی عصر (عج)، بیمارستان ولی عصر (عج)، گروه ارتوپدی

Email: behrouzi\_ahmadreza@yahoo.com

## مقدمه

پروستاگلندین‌ها شده و بازجذب استخوانی را افزایش می‌دهد (5، 6).

از سوی دیگر در برخی از مطالعات اخیر مدارکی از نقش اینترلوکین 17 (IL-17) در بروز استئوپروز به دست آمده است. اثر اینترلوکین 17 از طریق افزایش تولید استئوکلاست‌ها و کاهش تمایز سلول‌ها به استئوبلاست بوده و تحت تنظیم منفی استروژن می‌باشد (7). از آن جا که بسیاری از مطالعات این حوزه از نوع مطالعات حیوانی یا آزمایشگاهی بوده، مطالعه حاضر با هدف تعیین سطح سرمی TNF- $\alpha$  و IL-17 بیماران مبتلا به استئوپروز و مقایسه آن با افراد سالم طراحی و اجرا شده است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مشاهده‌ای تحلیلی 40 زن یائسه مبتلا به استئوپروز (postmenopausal osteoporosis) مراجعه کننده به درمانگاه ارتوپدی بیمارستان ولی عصر (عج) شهر اراک و 10 زن سالم از نظر استئوپروز مراجعه کننده به سایر کلینیک‌های بیمارستان پس از کسب رضایت نامه آگاهانه شرکت در مطالعه و با توجه به معیارهای ورود و خروج وارد مطالعه شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطح سرمی TNF- $\alpha$  و IL-17 افراد شرکت کننده در مطالعه اندازه گیری شده و بین دو گروه بیمار و سالم مقایسه گردید.

ابتلا به استئوپروز ( $T \text{ score} \leq -2/5$ )، سن 55-75 سال و گذشت یک سال از آخرین قاعدگی، از معیارهای ورود به مطالعه در گروه مورد بود. ابتلا به استئوپروز با استفاده از سنجش تراکم استخوان تعیین گردید. هزینه انجام دانسیتومتری استخوان در بیماران به عنوان بخشی از فرایند بررسی و درمان به عهده خود بیمار و در افراد گروه کنترل به عهده محقق بود. درمان با هورمون‌های زنانه (Hormone replacement therapy)، دریافت کلسیم و ویتامین D، سابقه یا درمان فعلی با داروهای شیمی درمانی، دریافت داروهای ضد TNF- $\alpha$ ، وجود شکستگی‌های استخوانی، ابتلا به بیماری‌های روماتولوژی و دریافت داروهای

استئوپروز دانسیته استخوانی پایین و از دست رفتن پیوستگی بافت استخوانی می‌باشد. در ایالات متحده حدود 10 میلیون نفر به این بیماری مبتلا بوده و 34 میلیون نفر کاهش دانسیته استخوانی دارند که سبب افزایش خطر شکستگی‌های استخوانی و عوارض ناشی از آن می‌شود (1).  
حفظ پیوستگی سیستم اسکلتی نیازمند ریمودلینگ مکرر سلول‌های استخوانی (استئوسیت) و فعالیت منظم و هماهنگ استئوبلاست‌ها و استئوکلاست‌ها می‌باشد. استئوکلاست‌ها از خانواده ماکروفاژ-مونوسیت‌ها بوده و تحت تاثیر دو سیتوکاین فاکتور محرک کلونی ماکروفاژ (Macrophage colony stimulating Factor- M-CSF) و فعال کننده گیرنده فاکتور داخل هسته‌ای لیگاند K-B (RANKL) به استئوکلاست تبدیل می‌شوند. سرعت فعالیت و جایگزینی استئوکلاست‌ها بیش از استئوبلاست‌ها می‌باشد از این رو هر عاملی که باعث افزایش فعالیت استئوکلاستی شود سبب کاهش دانسیته استخوان خواهد شد (2). عوامل گوناگون از جمله تغییرات هورمونی ناشی از یائسگی، بیماری‌های ژنتیک و بیماری‌های زمینه‌ای یا درمان آنها سبب عدم تعادل فعالیت استئوکلاست‌ها و استئوبلاست‌ها و در نتیجه استئوپروز می‌شود (3).

مطالعات گوناگونی به بررسی مسیرهای فیزیولوژیک بازسازی استخوانی پرداخته‌اند. استروژن اثرات مستقیم و غیر مستقیمی در متابولیسم استخوانی دارد. هورمون استروژن مهم‌ترین تنظیم کننده متابولیسم استخوان در مردان و زنان است و به صورت مستقیم با مهار بازسازی استخوانی و باز جذب آن از طریق مهار فعالیت استئوکلاست‌ها نقش بسیار مهمی در حفظ بافت استخوانی دارد (4). تاثیر غیر مستقیم استروژن نیز از طریق سیستم ایمنی و سیتوکاین‌ها می‌باشد. برخی مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که کاهش استروژن سبب افزایش برخی سیتوکاین‌ها از جمله اینترلوکین‌های 1 و 6، فاکتور نکروز توموری آلفا (Tumor necrosis factor- TNF) و

میانگین سنی بیماران گروه مورد و شاهد به ترتیب  $57/2 \pm 8/42$  و  $43/39 \pm 6/21$  سال بود. شاخص توده بدن (Body mass Index- BMI) افراد مورد مطالعه نیز اندازه گیری شد که میانه آن در گروه مورد و شاهد به ترتیب  $30/12$  و  $29/91$  کیلوگرم بر مترمربع بود. تفاوت آماری معنی داری در متغیرهای سن و شاخص توده بدن بین دو گروه وجود نداشت.

میانگین سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-17A$  در افراد مورد مطالعه به ترتیب  $241/32 \pm 849/78$  و  $2/68 \pm 35/41$  پیکوگرم در میلی لیتر بود. نتایج بررسی سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-17A$  به تفکیک دو گروه مورد و شاهد در جدول 1 آمده است.

گلوکوکورتیکوئیدی و ابتلا به هر گونه بیماری التهابی و عفونی فعال نیز معیار خروج افراد از مطالعه بود.

از روش الیزا برای سنجش سطح سرمی  $TNF-\alpha$  (Human  $TNF-\alpha$  ELISA Development Kit) و  $IL-17A$  (Human  $IL-17A$  ELISA Development Kit) استفاده شد. کیت های مذکور از شرکت پپروتک (PeproTech) تهیه شده بود. پس از اندازه گیری سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-17A$  داده های مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 19 آنالیز شده و داده های دو گروه با استفاده از آزمون تی مستقل مقایسه شد.

### یافته ها

جدول 1. سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-17A$  به تفکیک دو گروه مورد و شاهد (پیکوگرم در میلی لیتر)

متغیر	گروه	میانگین $\pm$ انحراف معیار	انحراف از میانگین
$TNF-\alpha$	مورد	957/70 $\pm$ 489/013	77/32
	شاهد	418/092 $\pm$ 176/7	55/88
$IL-17A$	مورد	95/235 $\pm$ 36/73	5/81
	شاهد	125/76 $\pm$ 30/612	9/68

توزیع متغیرهای مورد بررسی نرمال بود از این رو از تست های پارامتری (آزمون تی مستقل) برای مقایسه آن در دو گروه استفاده شد که در جدول 2 آمده است.

جدول 2. مقایسه سطح سرمی  $TNF-\alpha$  و  $IL-17A$  در دو گروه مورد و شاهد (پیکوگرم در میلی لیتر)

متغیر	آماره t	درجه آزادی (df)	p	فاصله اطمینان	
				سطح بالا	سطح پایین
$TNF-\alpha$	-3/412	48	*0/001	-221/579	-857/636
$IL-17A$	2/421	48	*0/019	55/875	5/174

\*از نظر آماری معنی دار

### بحث

طی سال های اخیر مطالعات گوناگونی به بررسی نقش سلول های ایمنی و سیتوکاین ها در استئوپروز پرداخته اند. در مطالعه اوانال و همکارانش مشاهده گردید که میزان فعالیت سلول های T, B, و فاکتور محرک کلونی ماکروفاژ در زنان یائسه 2 تا 3 برابر بیش از زنان غیر یائسه یا

طبق نتایج مطالعه حاضر سطح سرمی  $TNF-\alpha$  در گروه مورد بیش از گروه شاهد بود ولی سطح سرمی  $IL-17A$  در گروه شاهد به صورت معنی داری بیش از گروه مورد بود.

دارند و مهار فعالیت آنها می‌تواند به عنوان یک روش موثر در پیشگیری بروز استئوپروز ناشی از کمبود استروژن مد نظر قرار گیرد (12). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات مذکور هم‌خوانی ندارد. در مطالعه ما سطح سرمی IL-17A گروه مورد کمتر از گروه شاهد بوده است.

اینترلوکین 17 سبب افزایش فعالیت TNF- $\alpha$  و اینترلوکین 1B می‌شود که هر دو در شروع آبشار التهابی موثر بر استئوپروز نقش کلیدی دارند و موش‌های با جهش در گیرنده TNF- $\alpha$  و اینترلوکین 1B در مقابل استئوپروز ناشی از اوواریکتومی مصون می‌باشند (13). اگر چه اینترلوکین 17 با فاکتور نکروز توموری آلفا اثر سینرژیک داشته و باعث افزایش متابولیسم استخوانی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید می‌شود ولی نقش آن در استئوپروز مشخص نیست (14). در یک مطالعه بر نمونه‌های حیوانی حذف‌گیرنده‌های IL-17A در موش‌ها از بروز استئوپروز جلوگیری نکرده است. در این مطالعه محقق اشاره نموده از آن جا که فعالیت IL-17A در همراهی با سایر اینترلوکین‌ها سبب استئوپروز می‌شود انتظار داشته است که در موش‌های بدون گیرنده IL-17A، استئوپروز ناشی از اوواریکتومی رخ ندهد که چنین نبوده و حتی بیش از نمونه‌های وحشی دارای گیرنده IL-17A دیده شده است (15). محقق جهت یافتن علت به بررسی سایر سیتوکاین‌ها و مقایسه آنها قبل از برداشت تخمدان‌ها و 5 هفته بعد از آن در دو گروه بدون گیرنده IL-17A و موش‌های وحشی پرداخته است که تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشت. محقق بیان کرده است که یا اینترلوکین 17 مستقل از سایر سیتوکاین‌ها عمل می‌کند یا تاثیر آن موضعی بوده و در خون محیطی نشان داده نمی‌شود. در نهایت عنوان نموده که مکانیسم استئوپروز هم چنان نامشخص بوده و نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

عدم دسترسی به زنان سالم و بدون استئوپروز در محدوده سنی مورد نظر این مطالعه از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد. از سوی دیگر بررسی نقش استروژن بر

زنان تحت درمان با استروژن می‌باشد. این مطالعه پیشنهاد نموده است که فعالیت استئوکلاستی متأثر از افزایش فعالیت سلول‌های B, T در زمان کمبود استروژن می‌تواند سبب از دست رفتن بافت استخوانی شود که این نتایج توسط برخی مطالعات حیوانی نیز مورد حمایت قرار گرفته است (8).

یک مطالعه بالینی دیگر نیز با استفاده از روش فلوسیتومتری نشان داده است که درصد سلول‌های استئوکلاستی ناشی از افزایش فعالیت سلول‌های T و افزایش سطح سرمی TNF- $\alpha$  در زنان یائسه مبتلا به استئوپروز بیش از زنان یائسه سالم می‌باشد (9). در مطالعه دیگری مشاهده شد که میزان اسکروتین در گردش خون زنان یائسه مبتلا به استئوپروز به صورت معنی داری بیش از زنان پیش از یائسگی است و میزان اسکروتین ارتباط معکوس با سطح سرمی استروژن آزاد دارد (10). برخی مطالعات آزمایشگاهی بر نقش افزایش میزان TNF- $\alpha$  در کمبود استروژن تاکید دارند و ممکن است افزایش اسکروتین به علت افزایش فعالیت TNF- $\alpha$  در زنان یائسه از مکانیسم‌های بروز استئوپروز باشد (11).

در مطالعه حاضر نیز میزان TNF- $\alpha$  در زنان مبتلا به استئوپروز به صورت معنی داری بیش از زنان سالم بود که می‌تواند تاییدی بر نتایج سایر مطالعات فوق الذکر باشد. در این مطالعه از زنان غیر یائسه به عنوان گروه کنترل استفاده شد و عدم امکان دسترسی به جمعیت بیشتری از زنان سالم از محدودیت‌های مطالعه بود.

در مطالعه دیگری به نقش اینترلوکین 17 در افزایش فعالین استئوکلاستی و کاهش افتراق سلول‌ها به استئوبلاست اشاره نموده است که میزان آن با میزان استروژن ارتباط معکوس دارد. بنابر این مهار اینترلوکین 17 با استفاده از آنتی‌بادی‌های انسانی در زنانی که اوواریکتومی (ovariectomy) شده‌اند می‌تواند از تخریب استخوانی جلوگیری نماید (7).

در مطالعه دیگری که در سال 2012 بر نمونه‌های حیوانی انجام شده است مشاهده می‌شود که TNF- $\alpha$  و IL-17 نقش کلیدی در بروز استئوپروز پس از یائسگی

National Academy of Sciences. 1991;88(15):6613-7.

5- Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(46):28890-7.

6- Breuil V, Ticchioni M, Testa J, Roux C, Ferrari P, Breittmayer J, et al. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the Immunos study. *Osteoporosis international*. 2010;21(5):805-14.

7- Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PloS one*. 2012;7(9):e44552-3.

8- Onal M, Xiong J, Chen X, Thostenson JD, Almeida M, Manolagas SC, et al. Receptor activator of nuclear factor Kb ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(35):29851-60.

9- D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza SZ, Cristofaro MA, Tamone C, et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. *Bone*. 2008;43(1):92-100.

10- Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(4):1991-7.

11- Kim B-J, Bae SJ, Lee S-Y, Lee Y-S, Baek J-E, Park S-Y, et al. TNF- $\alpha$  mediates the stimulation of sclerostin expression in an estrogen-deficient condition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;424(1):170-5.

استئوپروز و بررسی همبستگی آن با سیتوکاین‌ها در ایجاد بیماری به علت هزینه بالای انجام آزمایشات قابل انجام نبود.

### نتیجه‌گیری

سطح سرمی TNF- $\alpha$  در زنان مبتلا به استئوپروز به صورت معنی داری بیش از زنان سالم بود که نشان‌دهنده نقش آن در بروز بیماری و نقش احتمالی مهارکننده‌های TNF- $\alpha$  در پیشگیری و درمان استئوپروز می‌باشد ولی با توجه به داده‌های اندک درباره نقش IL-17A در بروز استئوپروز نمی‌توان مکانیسم بروز بیماری را به روشنی توضیح داد. از این رو انجام مطالعات بیشتر با هدف بررسی IL-17A و نقش آن در نمونه‌های حیوانی و انسانی لازم به نظر می‌رسد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک به انجام رسیده و با کد 2-120-90 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه مذکور تصویب شده است. بدین وسیله گروه محققین کمال تشکر خود را از پرسنل محترم بیمارستان ولیعصر (عج)، آزمایشگاه مرجع و بیماران شرکت کننده در طرح اعلام می‌دارد.

### منابع

- 1- Faienza MF, Venture A, Marzano F, Cavallo L. Postmenopausal Osteoporosis: The Role of Immune System Cellis. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 575936.
- 2- Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(12):3318-25.
- 3- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention D, Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*. 2001;285(6) : 785-95.
- 4- Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proceedings of the*

- 12- DeSelm CJ, Takahata Y, Warren J, Chappel JC, Khan T, Li X, et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(9):2895-902.
- 13- Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. 2008;41(2):84-91.
- 14- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
- 15- Goswami J, Hernández-Santos N, Zuniga LA, Gaffen SL. A bone-protective role for IL-17 receptor signaling in ovariectomy-induced bone loss. *European journal of immunology*. 2009;39(10):2831-9.