

A raloxifen a humán trabekuláris csontállományból izolált osteoblastokban egyidejűleg serkenti az osteoprotegerin- és gátolja az interleukin-6 termelést

V. Viereck, C. Gründer, S. Blaschke. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 4206-4213.

A szelektív oestrogen-receptor modulátor (SERM) raloxifen az osteoporosis megelőzésében és kezelésében széles körben elterjedt csontreszorpció-gátló. A raloxifen nem fejt ki ösztrogén-szerű hatást az ivarszervek szöveteiben, továbbá nem fokozza az emlő- és az endometrium carcinoma kialakulásának kockázatát. Így a raloxifen egyre nagyobb jelentőségre tesz szert a posztmenopauzális nők által elszenvedett csigolyatörések visszaszorításában. Egyre kiterjedtebb alkalmazása ellenére, a csontszöveti hatásainak úgy sejt szintű, mint molekuláris mechanizmusai is még kevésbé ismertek.

Az ösztrogének az osteoclastok aktivitásának csökkentésével közvetlenül, illetve az osteoblastokban képződő parakrin csontreszorpció-serkentő faktorok (IL-1 β , IL-6 és TNF- α) termelésének gátlásával közvetve is mérséklék a csontreszorpciót. A nukleáris faktor- κ B receptor/aktivátor ligandja (RANKL), a TNF-ligand család egyik tagja és ennek receptora (RANK), valamint a receptor antagonistájaként ható osteoprotegerin (OPG) nélkülözhetetlenek az osteoclastok képződésének és aktiválásának irányításában. Az OPG „csali” receptorként megköti a RANKL-t és ezáltal megakadályozza, hogy a RANKL az osteoclastok felszínén lévő RANK-hoz kapcsolódjon és ennek aktiválását kiváltja.

Anyag és módszer

Traumás csonttörés miatt műtétre szoruló 5 betegen (4 nő és 1 férfi, átlagéletkoruk 36,4 \pm 7,1 év) végeztek csípőlapát (crista ilei) biopsziát. Az egyes betegektől vett humán osteoblast (hOB) sejtek tenyészetein a következő vizsgálatokat végezték: immuncitokémiai vizsgálatok, RT-PCR elemzés, DNS elemzés, összfehérje-mennyiség meghatározás, OPG és IL-6 fehérje-mennyiség mérése, az AP aktivitás és a prokollagén-I elválasztás mérése.

Eredmények

Az ER- α és ER- β RNS kimutatása céljából azonos feltételek között elvégzett kvantitatív PCR-vizsgálat eredménye szerint: a 13. napon a hOB-tenyészet ER- α mRNS mennyisége több mint százszorosra volt az ER- β mRNS mennyiségénél. Habár a 72 órás, 10⁻⁷ mol koncentrációjú raloxifen-expozíció következtében 7–11-szeresére növelte az ER- α mRNS expresszióját ($p < 0,0005$), ugyanakkor az ER- β mRNS expressziója ingadozóan és nem szignifikáns mértékben ($p = 0,15$) csupán kb. kétszeresére nőtt. Az immuncitokémiai elemzéssel ER- α és ER- β proteint is kimutattak a hOB sejtekben. Az ER funkcionális

aktivitásának elemzése érdekében az ER-target PR gén expresszióját vizsgálták raloxifen, illetve 17 β -oestradiol kezelés után. Mindkét szer dóziszfüggően és időarányosan közel háromszorosára növelte a PR gén expresszióját ($p < 0,001$). Az immuncitokémiai elemzés PR-fehérje expressziót mutatott ki a humán osteoblastokban.

A raloxifen az OPG-mRNS expressziójára kifejtett, ösztrogén-szerű hatásának tanulmányozása céljából időbeli és dóziszfüggő kísérleteket végeztek. Raloxifen hatására dóziszfüggően és időarányosan nőtt a hOB sejtek OPG-mRNS szintje és fehérje-elválasztása ($p < 0,001$). A maximális hatást kiváltó raloxifen dózis (10⁻⁷ mol, 72 órány át) alkalmazásakor az OPG-mRNS szint és fehérje koncentráció dóziszfüggő indukciója 2,2–2,9-szeres volt. Figyelemreméltó, hogy a raloxifen a 17 β -oestradiolhoz hasonló mértékben fokozta az OPG gén-expressziót és a fehérje-elválasztást. A kinetikai vizsgálatok alapján a raloxifen serkentő hatása 48–72 óra elteltével tetőzött és 5,2-szeres volt ($p < 0,001$ a fehérjeszintekre vonatkozóan). A raloxifen stimuláló hatása ebben a tekintetben is hasonlóan bizonyult a 17 β -oestradioléhoz.

A raloxifen 25, illetve 45%-kal csökkentette a csontreszorpciót előidéző IL-6 citokin gén-expresszióját és fehérje-elválasztását ($p < 0,001$). Az IL-6 fehérje termelését legjelentősebben gátló koncentráció 10⁻⁷ mol volt. A raloxifen IL-6 gén-expressziót és fehérje-szekréciót gátló hatásának mélyrehatóbb tanulmányozása céljából 0–72 órás időszakban vizsgálták a bekövetkező változásokat. A raloxifen időarányosan csökkentette az IL-6-mRNS steady-state koncentrációját és a fehérje-elválasztást; hatása 24–48 óra elteltével tetőzött ($p < 0,001$).

Az osteoblast-differenciálódás sejt szintű markereinek elemzése kimutatta, hogy a raloxifen fokozza az 1-es típusú kollagén elválasztását és az AP-aktivitást. Nevezetesen, 72 óra elteltével a raloxifen hatására 2,6-szorosra nőtt az 1-es típusú kollagén mRNS mennyisége ($p < 0,0001$). Ezen kívül, a raloxifen a PICP (1-es típusú kollagén) fehérje-szekrécióját is időarányosan, 2,6-szorosára növelte ($p < 0,0001$); hatása 72 óra elteltével tetőzött. A raloxifen-kezelés dóziszfüggően növelte az 1-es típusú kollagén mRNS-ének steady-state koncentrációját és a fehérje-elválasztást is ($p < 0,0001$). A raloxifen az AP mRNS-expresszióját, illetve enzim-aktivitását (1,7-, illetve 2,2-szeresére) fokozó hatása úgyszintén dóziszfüggőnek bizonyult. A konstitutív osteocalcin-mRNS szint alacsony volt és (10⁻⁷ mol, 72 óra) raloxifen expozíció hatására sem változott számottevően ($p = 0,13$).

Annak kiderítése céljából, hogy a raloxifen OPG-termelést serkentő hatása közvetlenül és specifikusan az

ösztrogén-receptorokon keresztül érvényesül-e, raloxifen (10^{-7} mol, 72 órán keresztül) és szelektív ER-antagonista ICI 182,780 kombinációjával végeztek kísérleteket. Az ICI 182,780 (10^{-6} mol koncentrációban, 48 óra alatt) dózis-függően gátolta az OPG mRNS és fehérje-szintézis raloxifen-okozta növekedését – az utóbbit 49%/os mértékben ($p < 0,01$). A kizárólag ICI 182,780-vel történő kezelés csupán kismértékben gátolja az OPG expresszióját, ebből az következik, hogy a raloxifen serkentő hatása az ösztrogén-receptorokon (ER) keresztül érvényesül.

Megvizsgálták azt is, hogy raloxifen adásával ellensúlyozható-e az OPG-termelést in vitro a legerőteljesebben gátló glükokortikoidok hatása. A raloxifen teljes mértékben, dózis-függően kiküszöbölte a dexamethason OPG mRNS-transzkripciót és fehérje-szintézist gátló hatását ($p < 0,0001$).

Megbeszélés

A jelen vizsgálat bebizonyította, hogy a raloxifen egyidejűleg fokozza az OPG termelést és gátolja az IL-6 elválasztást a döntően ER- α receptorokat hordozó, ép humán osteoblastokban. Az egészséges fiatal donorok trabekuláris csontállományából nyert hOB-sejtek a csont-mátrix maturációs fázisára jellemző osteoblast fenotípussal rendelkeznek, és elsősorban az endogén ER- α , valamint az ER target-gén, a PR expressziójában játszanak szerepet.

A tanulmányozott, ösztrogén-érzékeny humán osteoblastokban a raloxifen OPG-termelést serkentő hatása idő- és dózisfüggőnek bizonyult, egyaránt megnyilvánult az mRNS-transzkripció és a fehérje-szintézis szintjén is, illetve megakadályozta a dexamethason-okozta szuppressziót, ugyanakkor a szelektív ER-antagonista ICI 182,780 hozzáadása meggátolta az OPG-termelést. Az újabb kutatások adatai szerint a raloxifen többféle mechanizmus révén befolyásolja az osteoclastok működését, részben közvetlenül, részben a TGF- β és TNF- α közvetítésével, a parakrin osteoblast-faktorok révén.

A raloxifen OPG és IL-6 termelést szabályozó hatása minőségi és mennyiségi jellemzőit tekintve egyaránt hasonló a 17 β -oestradioléhoz. Az utóbbi ugyanis ER- α receptorok aktiválásával fokozza az OPG termelést és gátolja az IL-6 elválasztást – ez amellet szól, hogy a raloxifen ER-agonistaként hat az osteoblastokra. A csontreszorpció-gátló OPG képződését serkentő és a csontreszorpció-fokozó IL-6 és IL-1 β citokinek termelését elnyomó raloxifen a csontreszorpció számára kedvezőtlen feltételeket teremt – erre vezethető vissza az osteoclastok működésének gátlása. Mindazonáltal, a raloxifen csontvázrendszerre kifejtett védő jellegű hatása nem merül ki a csontreszorpció mediátorainak (IL-1 β , IL-6 és OPG)

modulálásában. A raloxifen hepatocytákban az IGF-1, illetve osteoblastokban a TGF- β_3 és a BMP-4, ER- α -függő transzkripcióját indukálhatja – mindezek a csontképződés fontos serkentő tényezői. Ezekon túl nem zárható ki, hogy az ER- α is szerepet játszhat az osteoblast-osteoclast kölcsönhatások szabályozásában és a csontanyagcsere-folyamatok modulációjában.

Tekintve, hogy a raloxifen elősegíti az osteoblastok differenciálódását (serkenti az 1-es típusú kollagén-elválasztást és fokozza az AP-aktivitást) és hogy az osteoblastok OPG-termelése differenciálódásuk előrehaladásával fokozódik, a raloxifen serkentő hatásának hátterében feltehetően – legalább is részben – az osteoblastok differenciálódásának előmozdítása áll. Ezzel összhangban, több vizsgálat során is kimutatták, hogy a raloxifen elősegíti az osteoblastok differenciálódását.

A szerzők bebizonyították, hogy a SERM raloxifen – döntően ER- α receptorok révén történő gén-expresszió következtében – humán trabekuláris osteoblastokban egyidejűleg növeli az OPG-mRNS szintjét, fokozza a OPG-fehérje elválasztást és gátolja az IL-6 termelést.

Összefoglalás

A raloxifen pozitív vázrendszeri hatásait az ösztrogén-receptorok (ER) és az általuk modulált parakrin osteoblast-faktorok közvetítik. Az osteoclastok számára nélkülözhetetlen nucleáris faktor- κ B receptor aktivátor (RANK) ligandja (RANKL) serkenti a csontreszorpciót; ezt a ligandot az osteoprotegerin (OPG) semlegesíti. A közlemény a raloxifen humán osteoblastok (hOB) OPG termelésére kifejtett hatásainak vizsgálatáról számol be. A raloxifen fokozta az ER- α és a progesteron-receptorok gén-expresszióját. Ezen kívül, dózis- és időfüggően 2, illetve 4/szeresére növelte a hOB-ok OPG-mRNS szintjét és az OPG-fehérje szekrécióját, hatása 10^{-7} mol koncentráció mellett és 72 óra elteltével tetőzött ($p < 0,001$). Az ER-antagonista ICI 182,780 felfüggesztette a raloxifen OPG-termelésre kifejtett hatását. Ezen kívül, a raloxifen fokozta az osteoblast-differenciálódási markerek szintjét: háromszorosára növelte az 1-es típusú kollagén szekrécióját, illetve kétszeresére az alkalikus foszfatáz aktivitását ($p < 0,001$). Mindezekon túl, a raloxifen 25–45%-kal csökkentette a csont-reszorpciót elősegítő IL-6 citokin expresszióját ($p < 0,001$). Az adatok azt bizonyítják, hogy a raloxifen emberi osteoblastokban serkenti az OPG és gátolja az IL-6 termelést. Az osteoblastok érési folyamatának előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségben képződik OPG, ezért a raloxifen OPG termelést fokozó hatása minden bizonnyal az osteoblastok differenciálódását elősegítő aktivitására vezethető vissza.