

Az intermittáló PTH kezelés anabolikus hatásának molekuláris és sejtszintű mechanizmusai

Robert L. Jilka. Bone 2007.40.1434-1446

A parathormon (PTH) aminoterminális 1-34 peptidjét vagy a teljes peptidláncú PTH(1-84) fehérjét posztmenopauzás nőknek, idős férfiaknak, illetve glukokortikoid-okozta osteoporosisban szenvedő nőbetegeknek napi injekcióban adva növelhető a csonttömeg és csökkenthető a csonttörések gyakorisága.

Az intermittáló PTH kezelés anabolikus hatását egerben és patkányban is bizonyították. Ezeket a hatásokat a csontváz ismétlődő, múlt jellegű PTH-expozíciója idézi elő, ugyanis a hormon, beadása után 2-3 órával már nincs jelen a vérkeringésben. A csontváznak ez, a PTH vérszintjének ismétlődő, ciklikus emelkedésére adott anabolikus reakciója eltér a tartósan magas PTH szint hatásától és a csontok szivacsos, endocorticális és periosteális csontfelszínein zajló fokozott csontképződés eredménye.

Emberben a csonttömeg gyarapodásának üteme a PTH kezelés első 6-12 hónapjában a leggyorsabb, a fokozott csontképződés korán, már a kezelés 28. napján észlelhető. A kezelés 6. hónapjára a csontreszorpció mutatóinak szintjei is emelkednek.

Szöveti vizsgálatokkal bizonyították, hogy a fokozott csontképződés oka javarészt a csontmátrixot szintetizáló osteoblastok számának gyarapodása. A PTH ezen hatásának lehetséges mechanizmusai a fokozott osteoblast-képződést, az osteoblastok apoptózisának csökkenését és a nyugvó sejtvonalak aktiválódását tételezték fel. Ez a szemletanulmány ezeket a mechanizmusokat veszi szemügyre

Az osteoblast-szám szabályozásának alapvető vonatkozásai

Csontképződés és -átépülés

A felnőttek szivacsos csontállományában csak a csont átépülésének helyein zajlik csontképződés. E folyamat során az osteoclast és osteoblast populációk alkotta alapvető multicelluláris egység (BMU) göcökben új csont képződik az elöregedett helyett. A periosteális csontfelszínen is zajlik csontképződés, itt ennek nem előfeltétele az előzetes csontreszorpció. A szivacsos csontállomány átépülése a csontfelszín borító fedősejtek visszahúzódásával kezdődik. Ez után vérsajt-előalakokból kialakuló osteoclastok gyűlnek a helyszínre és mélyedést vájnak az elmeszesedett csontmátrixba. Ezt az üreget az osteoblastok töltik fel; ennek a folyamatnak három jól megkülönböztethető szakasza a kezdeti, a progressziós és a befejező fázis. A kezdeti fázisban a helyi mesenchymális őssejtekből kialakuló osteoblastok populációja gyűlik össze a reszorpciós üreg mélyén, majd elkezdődik a csontképző-

dés. Az utóbbi előrehaladása során az osteoblastok egy része osteocytaként a mátrixban reked, többségük azonban apoptosissal elpusztul. A csontképződés a reszorpciós lacuna feltelődésekor fejeződik be, az ekkor még életképes néhány osteoblast a nyugvó csontfelszín borító, lapos fedősejtté alakul át. A folyamat során keletkező osteocyták életképességét valószínűleg a csont fiziológias, mechanikai terhelésének serkentő hatása tartja fenn. Ezek csökkenése esetén (például a súlytalanság állapotában) az osteocyták apoptosissal elpusztulnak.

A csontképződés minden egyes fázisa alkalmas arra, hogy intermittáló PTH kezeléssel növeljük az osteoblastok számát. Hisztomorfometriai mérések a mineralizálódó csontfelszín 3-5-szörös növekedését mutatták ki – ez az osteoblastok felszaporodását tükrözi. Az osteoblastok számának növekedése egerben már 2 napos kezelés után mutatkozik. A PTH az ásványi anyag lerakódás ütemét is növeli kb. 50%-kal. A mineralizálódó felszínéhez képest azonban a lerakódás üteme kisebb mértékben nő, ezért a csontképződés PTH hatására bekövetkező fokozódása javarészt az osteoblastok számának növekedésével magyarázható.

PTH-val kezelt kísérleti alanyokban a csontképződés fokozódása zömmel a már létező BMU-kban észlelhető. A BMU-kkal szomszédos felszíneken is keletkezik új csont. A csonttömeg ilyen gyarapodását anabolikus csonthatásnak nevezik. Más, a csonttömeget növelő szerek (például az alendronát) a csontreszorpciót állítják le és ezáltal lehetővé teszik, hogy a már létező osteoblastok feltöltsék a reszorpciós üreget – ez az ún. anti-katabolikus hatás.

Az intermittáló PTH kezelés és az állandóan magas PTH szint BMU-ra kifejtett hatásai különbözőek. Hyperparathyreosisban a felfokozott átépülés miatt csökken a csonttömeg, mert az egyes BMU-kban a csontreszorpció kerül túlsúlyba.

A képződés és pusztulás, mint az osteoblastok számának meghatározói

Az osteoblastok számát képződésük és pusztulásuk ütemének egyensúlya határozza meg. A csontvelői, pluripotens, mesenchymális őssejtekén kívül más sejttípusokból (például csontvelői zsírsejtekből) is keletkeznek osteoblastok. Az sejt-differenciálódás előrehaladtával végül kialakulnak a mátrix-szintetizáló osteoblastok.

Az apoptózis az osteoblastok számának döntő meghatározója, azonban múlt jelenség, aminek nem marad nyoma, ha egyszer befejeződött. Az elpusztuló osteoblas-

tok hányadának megváltozása jelentősen befolyásolja a BMU-ban működő osteoblastok által megtermelt csont mennyiségét.

A PTH hatásának molekuláris mechanizmusa

A PTH és a PTHrP hatásai egy G-proteinhez kapcsolt receptor – ún. PTH-receptor 1 (PTHr1) közvetítésével érvényesülnek. A PTHr1 és ligand összekapcsolódása serkenti az adenylil-cyclase $G\alpha_s$ -mediált aktiválódását és ezáltal a cAMP képződést, mindez végül aktiválja a proteinkinase-t (PKA). A PTHr1 a proteinkinase-C (PKC) $G\alpha_q$ -mediált aktiválását is serkenti. Ráadásul, a PTH az extracellulárisan szabályozott kinase (ERK) jeltovábbítás β -arrestin közvetítésével megvalósuló aktiválódását is elindítja.

A PTH különböző aminoterminális fragmentumai különbözőképpen serkentik a jeltovábbítást. A PTH(1-34) és a PTH(1-31) anabolikus hatása patkányban egyenértékű, azonban a PTH(1-31) csak a cAMP-termelést, míg a PTH(1-34) a PKC-t is aktiválja. A cAMP-képződés PTH általi serkentése elegendő az osteoblastok számát növelő jeltovábbító kaszkádok elindításához, a PKC aktiválása azonban nem.

Miképpen növeli az intermittáló PTH kezelés az osteoblastok számát?

Az intermittáló PTH kezelés hatása az osteoblastok apoptosására

Egereket 28 napon keresztül 3-300 ng/g/nap PTH-val kezelve dóziszfüggően nőtt a csigolyák és a hátsó végtag csontozatának ásványi anyag sűrűsége, illetve ezzel párhuzamosan csökkent az osteoblastok apoptosisa. Hisztomorfometriai mérések szerint a PTH osteoblast-apoptosist gátló adagjainak hatására az osteoblastok száma, a csontképződés üteme és a szivacsos csontállomány mennyisége is növekszik.

Egérben a csigolyák periosteális felszínén – a szivacsos csontállományhoz képest – rendkívül alacsony az apoptotikus osteoblastok prevalenciája. Ha feltételezzük, hogy mind a két régióban azonos a sejtek élettartama, akkor ez amellől szól, hogy a periosteális felszínen zajló csontképződés során az osteoblastok csupán csekély hányada pusztul el. Ily módon, a csontszövet periosteális felszínén az osteoblastok apoptosisa gátlása nem járul hozzá számottevően az osteoblastok számának PTH kezelés okozta növekedéséhez.

Az egereken elvégzett *in vivo* vizsgálatok eredményeivel összhangban, *in vitro* kísérletek bebizonyították, hogy a rövid ideig tartó PTH- vagy PTHrP-expozíció felüggeszti különböző szereket az osteoblast tenyészetekben kifejtett, apoptosist elősegítő hatását.

Osteoblast sejtenyészeteken elvégzett vizsgálatok alapján vetették fel, hogy az intermittáló PTH kezelés rövid időszakokra aktiválja a jelzőfunkciókat és ez ismételtlen késlelteti az apoptosist – emiatt végső soron nő az osteoblastok száma.

Az intermittáló PTH kezelés hatása az osteoblast előalakok osztódására és differenciálódására

Az intermittáló PTH kezelés osteoblast előalakok osztódására kifejtett hatásait patkányokon tanulmányozták. A PTH hatására nőtt az osteoblastok száma a szivacsos csontállományban, az izotóppal megjelölt előalakokból kifejlődő, radioaktív osteoblastok részaránya azonban nem változott. Ily módon a szivacsos csontállományban lévő osteoblastok száma nem az osteoblast előalakok szaporodásának serkentésére vezethető vissza.

A sejtdifferenciálódás előfeltétele, hogy a sejt kilépjen a sejtciklusból. Számos *in vitro* vizsgálat bizonyította, hogy az osteoblastok differenciálódásának előrehaladásával párhuzamosan visszaszorul a sejtszaporodás. Lehetséges, hogy a PTH a sejtszaporodás elnyomásával serkenti az osteoblastok differenciálódását.

Az intermittáló PTH kezelés hatása a fedősejtek aktiválására

Patkányban, intermittáló PTH kezelés után, a szivacsos csontállományt befedő osteoblastok számának növekedésével ellentétben csökken a nyugvó csontfelszín borító lapos fedősejtek száma. Felvetették, hogy az intermittáló PTH kezelés hatására a fedősejtek visszaalakultak osteoblast típusú sejtekké. Ez a feltevés magyarázatot ad az osteoblastok PTH adása után észlelhető megjelenésére a korábban nyugvó csontfelszíneken. A fedősejtek aktiválódásának szerepet tulajdonítottak abban is, hogy a PTH csekély mértékű vagy éppen szünetelő csontátépülés esetén is növeli az osteoblastok számát, azonban ez a PTH osteoblast-differenciálódást serkentő hatásának következménye is lehet.

Az auto-/parakrin szabályozó tényezők szerepe az osteoblastok létrejöttében és túlélésében.

A PTH számos osteogén növekedési faktor és citokin, sőt antagonisták, illetve proteolízis-aktivátorok szintézisére is kihat. Ily módon, a PTH közvetve – az említett auto-/parakrin faktorok szabályozásával – serkenti az osteoblast előalakok és a kifejlett osteoblastok differenciálódását és túlélését. Génmódosított egereken végzett kísérletek eredményei alapján, az említett tényezők közül többnek is szerepe lehet a PTH anabolikus csonthatásában.

IGF-I

A PTH cAMP-függő mechanizmussal serkenti az osteoblastok differenciálódását és túlélését elősegítő IGF-I szintézisét. Patkányokat napi PTH injekcióval kezelve az osteoblastokban IGF-I transzkriptumok felszaporodását mutatták ki.

Az IGF-I intermittáló PTH kezelés anabolikus hatásának létrejöttében betöltött szerepével összhangban, IGF-I hiányos egereket hormoninjekciókkal kezelve nem fokozódott a periosteális csontképződés és nem nőtt

a tibiofibuláris átmenet kéregállományának vastagsága – míg vad típusú egerekben mutatkozott a várt anabolikus hatás. Egy másik vizsgálat megállapította, hogy IGF-I hiányos egereken PTH injekciókkal nem váltható ki anabolikus hatás a femur distális szakaszának metaphysisében, jóllehet vad típusú egerekben 40%-kal gyarapodott ennek a régióknak a csonttömege.

FGF-2

Egér osteoblast sejtenyészeten PTH hatására rövid időn belül, a cAMP termelés fokozódásnak köszönhetően felfeszaporodnak az osteoblast előalakok szaporodását serkentő és apoptosist késleltető FGF-2 transzkriptumok. Az IGF-2 anabolikus hatása a csontszövetre, azonban az intermittáló PTH kezeléssel ellentétben nem a trabeculák vastagságát, hanem azok számát és konnektivitását növeli.

Osteoclast eredetű faktorok

Az intermittáló PTH kezelés hatására átmenetileg emelkedik a RANKL szint, és emiatt ideiglenesen fokozódhat az osteoclastos csontreszorpció. Az utóbbi következtében a csontmátrixból felszabaduló, osteoblastogén növekedési faktorok további osteogén szignálként erősíthetik a PTH anabolikus hatását. Ezen kívül, a RANKL osteoblastogén faktor elválasztására serkentheti az osteoclastokat. A fokozott csontreszorpció kedvezőtlen hatása a PTH rövid ideig tartó, ciklikus adagolásával küszöbölhető ki – ily módon maximális csontképző hatás érhető el – és a lehető legnagyobb mértékben csökkenthető a csontreszorpciót serkentő hatás.

Fokozza-e az intermittáló PTH kezelés az endogén PTHrP osteogén hatásait?

A PTHrP szint tartós emelkedése (például rosszindulatú daganat esetén) a RANKL szintézis aktiválásával fokozza az osteoclastok képződését és a csontreszorpciót. A helyben képződő PTHrP az osteoblastok és előalakjaik differenciálódását és túlélését elősegítő aktivitásának, valamint a PTH hasonló hatásának ismeretében feltételezhető, hogy a naponta adott PTH injekciók csupán erősítik az eleve létező, csontképződést serkentő, a PTHR1 PTHrP általi aktiválásából származó biológiai szignálokat.

Az intermittáló PTH kezelés hatékonysága osteoporosisban

Az intermittáló PTH kezelés aktivál több, az osteoblastok fejlődését és túlélését elősegítő mechanizmust. Ennek köszönhető, hogy az intermittáló kezelés az osteoporoticus betegek zömében növeli a csonttömeget, mégpedig az osteoporosis kórélettani hátterétől függetlenül. A PTH által aktivált anyagcsereutak némelyike antagonizálhatja a csontvesztéshez vezető kóros mechanizmusokat.

Glukokortikoid-okozta osteoporosisban alacsony az osteoblastok száma. Intermittáló PTH kezelés hatására

még előrehaladott betegségben is hirtelen és nagymértékben nő a csonttömeg, az osteoblastok védelmet élveznek a glukokortikoidok apoptosist elősegítő hatásával szemben, és a glukokortikoidok csontképződésre kifejtett, kedvezőtlen hatása is mérséklődik. Az osteoblastok apoptosizálásának csökkentése már önmagában is fokozza a csontképződést. Az intermittáló PTH kezelés tehát visszafordítja a glukokortikoidok hatására bekövetkezett csontvesztést.

Összefoglalás

Az *in vitro* és *in vivo* adatok amellől szólnak, hogy a PTHR1 átmeneti aktiválása több, egymással összekapcsolódó anyagcsereutat működésbe hozva fokozza a túlélést elősegítő jelzőfunkciókat, csökkenti az osteoblast előalakok osztódását és fokozza azok differenciálódását, illetve serkenti az osteogén növekedési faktorok termelését és/vagy aktiválását. Mindezek következtében az osteoclastok által kivált reszorpciós lacunák feltöltéséhez szükségesnél nagyobb számban keletkeznek osteoblastok.

Az intermittáló parathormon (PTH) kezelés tehát az osteoblastok számának növelésével serkenti a csontképződést, ám e hatásának molekuláris és sejtszintű mechanizmusai nem teljesen ismertek. A PTH közvetlenül aktiválja az osteoblastok túlélési jelzőmechanizmusait. Az osteoblastok felszaporodása jelentős részben az apoptosizációra vezethető vissza – legalább is egerben. Ennek a hatásnak az érvényesüléséhez anti-apoptotikus aktivitású gének expressziója szükséges. Ezen kívül, a PTH csökkenti a cyclin D és fokozza több cyclin-függő kinase-gátló expresszióját – ennek következtében a replikálódó progenitor-sejtek kilépnek a sejtciklusból. Az utóbbi kedvező feltételeket teremthet a helyben képződő – és a PTH által bizonyítottan befolyásolt – növekedési faktorok és citokinek differenciálódást elősegítő és sejt-túlélést meghosszabbító hatásainak érvényesüléséhez. Génmódosított egereken tett megfigyelések amellől szólnak, hogy az intermittáló PTH kezelés anabolikus hatása csak inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I), és fibroblast növekedési faktor 2 (FGF-2) jelenlétében mutatkozik. A naponta, injekcióban adagolt PTH erősítheti a helyben képződő, parathormonnal rokon fehérje (PTHrP) differenciálódást elősegítő és sejt-túlélést meghosszabbító hatásait. Mindezek eredményeként az osteoblastok az osteoclastok által a csontátépülés során lebontott csontállomány pótlásához szükségesnél nagyobb számban halmozódhatnak fel. Az intermittáló PTH kezelés pleiotrop hatásai külön-külön mind növelhetik az osteoblastok számát; ez a lehetséges magyarázat arra, hogy ez a gyógyszer az osteoporosis kórélettani hátterétől függetlenül – visszafordítja a csontvesztést. Az intermittáló PTH kezelés erőteljes, életkorfüggő csontvesztést visszafordító hatása – legalább is egerben – minden bizonnyal a hormon osteoblastok differenciálódását és túlélését elősegítő hatására vezethető vissza.