

A PTH (parathormon), illetve a PTHrP (PTH-related peptide receptor) függő jelzőrendszerek szerepe a parathormon csontszövetre kifejtett anabolikus hatásában

D. Yang, R. Singh, P. Divietti és mtsai. *Bone*. 2007.40.1453-1461.

A parathormon (PTH) klasszikus hatásait a PTH/PTH-related-peptid receptor, más néven I-es típusú PTHR (PTH1R), a G-proteinhez kapcsolt receptorok (GPCR) B alsócsaládjának tagja közvetíti. Állatkísérletek és human vizsgálatok bizonyították, hogy az intermittáló (naponta kis dózisban) adott parathormon hatékonyan serkenti a szívacsos csontállomány képződését. A folyamatos, intenzív hormonhatás (például súlyos hyperparathyreosisban) ellenben a csontanyagcsere és a csontreszorpció fokozásával csökkenti a csonttömeget.

Kimutatták, hogy a PTH aminoterminális, 34 aminosav alkotta szekvenciájának működése azonos a teljes hormonéval, azaz teljes mértékben aktiválja a PTH1R jelzőfunkcióit. A PTH1R aktiválása többféle jeltovábbító rendszert is bekapcsol, többek között a $G\alpha$ -protein függő cAMP/proteinkinase-A, illetve PLC-függő és PLC-független proteinkinase-C rendszereket, továbbá az intracelluláris kalcium szintet is emeli. E jelzőrendszerek és a PTH anabolikus/katabolikus hatásainak kapcsolata élnk érdeklődés tárgya, mert a specifikus PTH-szignálok és a csontsejtek működéseinek változásai közötti összefüggések teljes megismerése után tökéletesebb gyógyszerek fejleszthetők csontbetegségek (például az osteoporosis) kezelésére.

A PTH(1-34) aminosav-szekvencián belül, több kulcsfontosságú ligand-tartományról derítették ki, hogy a PTH1R mely jelzőműködéseit aktiválja. A PTH anabolikus hatását a cAMP közvetíti. A szerzők ebben a vizsgálatban két, a jelzőfunkciókra szelektíven ható peptid [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-28) és [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-34), valamint PTH(1-34) alkalmazásával *in vivo* vizsgálták a PTH hatására aktiválódó, különféle jelzőrendszerek anabolikus hatásait. Tesztelték továbbá azt a feltételezést is, miszerint a PTH1R hatására a PLC-től függően, vagy attól függetlenül aktiválódó, PKC-jelzőmechanizmus is hozzájárul a csonton érvényesülő anabolikus hatáshoz.

Anyag és módszer

Tízhetes, nőstény egereket 4 hétig, heti 5 napon keresztül kezeltek 40 μ g/kg humán PTH(1-34)-gyel, 120 μ g/kg [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-28)-analóggal, illetve 800 μ g/kg [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-34)-analóggal. (A hormon dózisosok a szérumban észlelhető cAMP-szint emelkedése, illetve azt követően a csontban észlelhető cAMP-függő géneexpresszió mértéke alapján ekvipotensek voltak.) Az előzetes PTH kezelés

nem csökkentette a szérumban cAMP-szint akut változásait, melyeket 4 héttel később ismét ellenőrizték. DEXA-val mérték a teljes csontváz, a teljes femur és a centrális femur-metaphysis csontsűrűségét. Kvantitatív mikrocomputer-tomográfiával (μ CT) vizsgálták a trabekuláris állomány háromdimenziós morfológiai jellemzőit a L.V-csigolya és a femur distalis metaphysisén. A kéregállomány geometriáját a femur diaphysis középső szakaszán vizsgálták, valamint elvégezték a tibia trabekuláris állományának hisztomorfometriás vizsgálatát.

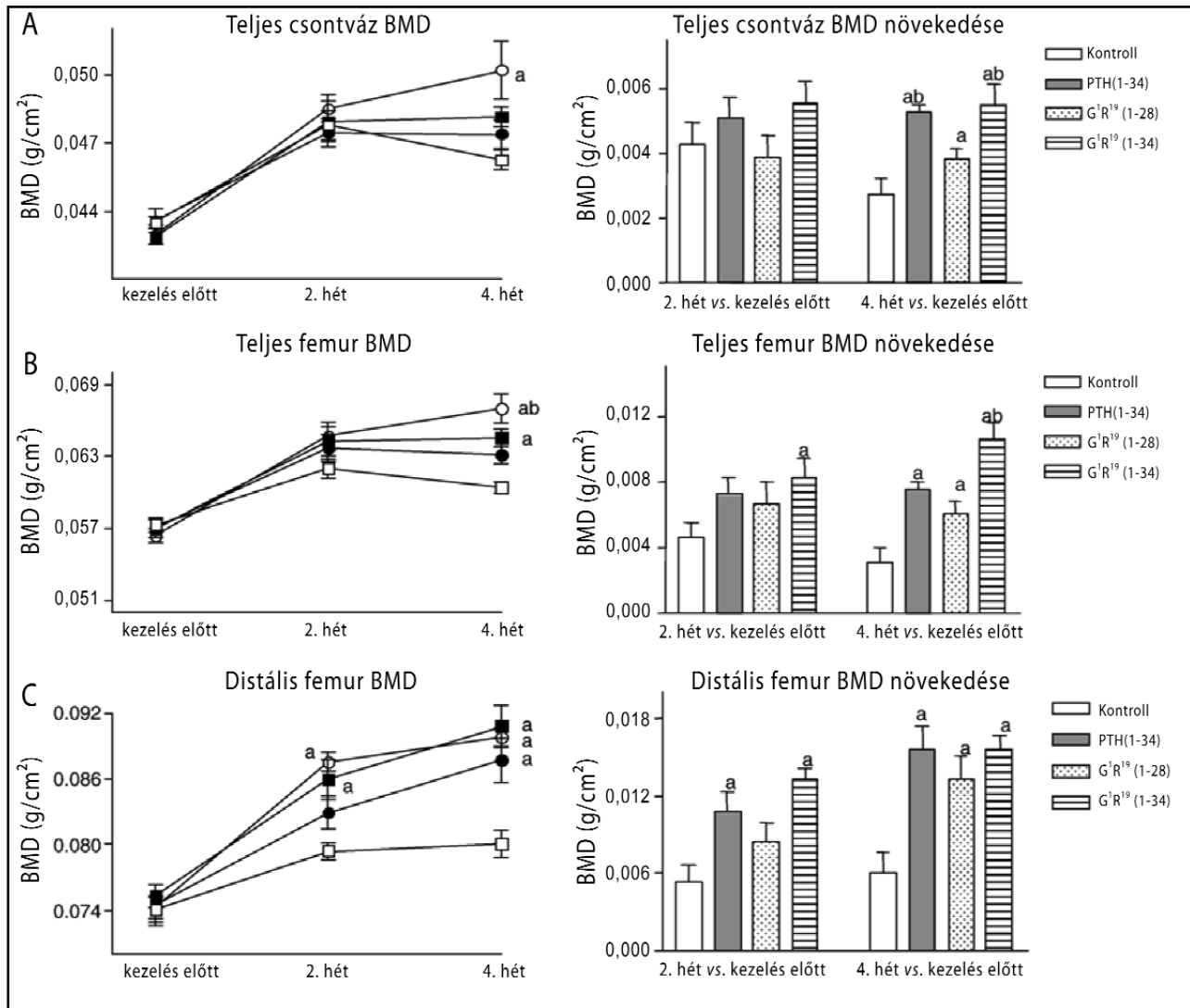
Eredmények

A háromféle PTH-peptid hatására azonos mértékben nőtt a femur distalis szakaszának ásványianyag-sűrűsége (BMD), valamint (μ CT vizsgálat alapján) ezen régió és a csigolyák csontállományának térfogata, a trabekulák vastagságával együtt, továbbá a középső femur-szakasz kéregállományának endostealis felszínén zajló appozíciós csontképződés. A [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-34)-analóg és a hPTH(1-34) hatására gyorsabb ütemben nőtt a distalis femur szakasz csontsűrűsége, illetve nagyobb volt a teljes csontváz csontsűrűségének, illetve a proximális tibia szakasz trabekuláris térfogatának növekedése, mint [Gly^1, Arg^{19}]hPTH(1-28)-analóg adása után (*ábra*).

Megbeszélés

A PTH(1-34) a PTH1R-ek közvetítésével aktiválja a $G\alpha s$ /cAMP/PKA és a $G\alpha q$ /PLC/PKC rendszereket; azonban a PLC-től független, a PTH(29-34) szekvencia jelenlétét igénylő mechanizmus révén is képes aktiválni a PKC-t. A PTH1R-ek közvetítésével zajló PKC jeltovábbításnak – mindenekelőtt a ligand PTH(29-34) szakasz által stimulált PKC-nak – szerepet tulajdonítottak az osteoblastikus csontképzés elindításában. A vizsgálat stratégiája az volt, hogy az említett analógokat olyan dózisban adagolják – intermittáló terápiás séma szerint – a kísérleti egereknek, hogy az *in vivo* cAMP/PKA jelzőrendszert a 40 μ g-os dózissal standard PTH(1-39) hatásával azonos mértékben aktiválja; majd ezt követően, azoknak a csontszöveti hatásokban mutatkozó különbségeknek a kiderítése, amelyek – a csontsejtekben lévő PTH1R-hez kötődő – egyik, vagy mindkét PKC-aktiválási mechanizmus kiérésére vezethetők vissza.

A 4 hetes anabolikus kezelés következtében, a PTH(1-



A PTH(1-34), Gly¹,Arg¹⁹(1-28) és Gly¹,Arg¹⁹(1-34) hatása a csontsűrűsége. Négy csoportba sorolt 10-10 egeret véletlenszerűen kezeltek, napi adagolásban, 4 héten keresztül (hetenként 5 napon át) subcutan injekcióban adott vizsgálati készítményekkel: PTH(1-34) – 40 µg/kg (kitöltött négyzetek a bal oldalon), Gly¹,Arg¹⁹(1-28) – 800 µg/kg (kitöltött körök), Gly¹,Arg¹⁹(1-34) – 120 µg (üres körök); vehiculum (üres négyzetek). A teljes csontváz (A), a teljes femur (B) és a femur distalis szakaszának (C) csontsűrűségét a kezelés elkezdése előtt, majd 2, illetve 4 hetes kezelés után mérték meg. Bal oldalon az egyes csoportokban mért BMD abszolút értékeinek átlaga látható (átlag±SE, g/cm²). Jobb oldalon az egyes állatok csontsűrűségének – kezelés előtti értékhez viszonyított – 2, illetve 4 hetes kezelés után észlelt változásának csoportonkénti átlaga látható. a) $p < 0,05$ vs. vehiculum; b) $p < 0,05$ vs. Gly¹,Arg¹⁹(1-28)

34)-re, valamint mindkét Gly¹,Arg¹⁹-szubsztituált analógra fellépő akut cAMP-válasz hasonló mértékűnek bizonyult. A három tesztelt PTH-peptid *in vivo* bioekvivalens dózisa-it a – mindhármukra jellemző – cAMP termelést serkentő hatásuk alapján határozták meg. A PCL-deficiens PTH-analógok csonthatásait a teljes csontváz, a teljes femur és a femur distalis szakasz BMD *in vivo* mérésével, továbbá a csigolyák, és a femur distalis és középső szakaszának µCT-s mikroszerkezet-vizsgálatával, illetve a tibia proximális szakaszán a trabekulák kvantitatív hisztomorfometriai elemzésével értékelték. Mindhárom tesztelt PTH-peptid hasonló mértékű hatást fejtett ki a trabekuláris csontválasz szokványos mutatóira (pl. a femur distalis szakasz BMD-re és a trabekula-vastagságra). Ezek az eredmények

amellett szólnak, hogy a PTH1R-aktiválás hatására bekövetkező cAMP/PKA reakció a trabekuláris csontállományon érvényesülő anabolikus hatás fontos meghatározója. A femur középső szakasz kéregállományának µCT vizsgálata kimutatta, hogy PTH hatására csökkent a velőűr és nőtt a csontállomány keresztmetszetének felszíne, a kéregállomány vastagsága és a csontfelszín/teljes felszín hányados (a teljes keresztmetszeti felszín változása nélkül). Ezek a változások azt tükrözik, hogy az endostealis felszínen új csontállomány appozicionális lerakódása zajlik. A kéregállomány ezen szerkezeti változásai PTH(1-34) és mindkét Gly¹,Arg¹⁹-szubsztituált analóg adása után egyaránt bekövetkeztek, ami úgyszintén a cAMP/PKA – PTH1R jelzőrendszer domináns szerepére utal.

Bár a teljes csontváz BMD elsősorban a kortikális átlomány változását tükrözi, μ CT elemzés szerint a femur középső szakaszán mind a három peptid azonos mértékben serkentette az endostealis felszín kéregállományának gyarapodását. Elképzelhető, hogy a teljes csontváz BMD mérés esetében megfigyelt, PLC-től független PKC-hatás nem a femur diaphysis közepén, hanem más kompakt csontszövetből álló régiókban érvényesülő hatásokat tükröz, netán az újonnan keletkezett kortikális csontállomány fokozott ásványianyag-sűrűségét jelzi. Megvizsgálták azt a lehetőséget is, hogy a PLC-től független PKC-nak tulajdonított, a trabekuláris reakciót gyorsító és a teljes csontváz csontsűrűségét növelő hatások a fejlődő állatok csontjainak növekedési zónáiban érvényesülő hatással függnek-e össze. A tibia proximalis szakaszának hisztomorfometriai elemzése szerint, ennek a – testsúlyt hordozó – csontnak az esetében, PTH(1-34), Gly¹,Arg¹⁹(1-28) és Gly¹,Arg¹⁹(1-34) hatására valóban nagyobb mértékben nőtt a trabekulák száma a közvetlenül a növekedési zóna alatt elhelyezkedő régióban.

Következtetések

A cikk megállapításai azt támasztják alá, hogy a PTH1R-aktiválás kiváltotta cAMP/PKA-válasz az elsődleges mechanizmus az anabolikus hatás megvalósításában. Mindazonáltal, a 29-34 aminosavak alkotta szekvenciát tartalmazó PTH-peptidek adásával serkenthető PLC-független PKC-rendszer láthatóan felgyorsítja a szivacsos csontállomány nettó gyarapodásának ütemét, növeli a teljes csontváz BMD-t, és a testsúlyt hordozó csontok (például tibia) növekedési zónáival szomszédos területen növeli a trabekulák számát és vastagságát. Ezek az eredmények cáfolják, hogy a PLC-függő PTH1R-jelzőrendszer jelentős szerepet töltene be az intermittáló exogén PTH-expozíció anabolikus csonthatásában. A PTH csontvázra kifejtett hatásaiban közreműködő PLC-független PKC-jeltovábbítás lehetséges mechanizmusainak feltárásához további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás

A parathormon az osteoblastok működését PTH/PTHrP-receptorok (PTH1R-ek) aktiválásával szabályozza. Az utó-

biak többféle jeltovábbító rendszert is bekapcsolnak egyidejűleg, többek között a cAMP/proteinkinase A-t (PKA) és a proteinkinase C-t (PKC) – az utóbbit foszfolipáz-C (PLC) működéstől függő, illetve attól független mechanizmusok révén. Ezek a jelzőrendszerek a PTH(1-34) molekula különböző tartományaihoz kapcsolhatók, az intermittáló PTH-kezelés *in vivo* érvényesülő, anabolikus hatásában betöltött szerepük azonban tisztázatlan. Egéren végzett állatkísérletek során a hPTH(1-34) anabolikus hatásait hasonlították össze két, az előbbihez képest korlátozott PTH1R-jelzőfünciójú analógokéval. A [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-28) analógból hiányzik a hPTH(1-34) 29-34 tartománya (amely a PKC PCL-független aktiválásához szükséges), a PLC aktiválását megakadályozó Gly1 mutációt hordoz, és kizárólag a cAMP/PKA jelzőrendszert serkenti. A [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-34) analóg 29-34 tartománya érintetlen, ezért a cAMP/PKA jelzőrendszeren kívül a PKC-t is aktiválja, PCL-független mechanizmussal. Tízhetes nőtény egereket 4 héten keresztül (heti 5 napon át) kezeltek 40 μ g/kg humán PTH(1-34)-gyel, 120 μ g/kg [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-28) analóggal, illetve 800 μ g/kg [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-34) analóggal. (A hormondózisok ekvipotensek voltak.) Az előzetes PTH-kezelés nem csökkentette a szérum cAMP-szint akut változásait, melyeket 4 héttel később ismét ellenőriztek. A háromféle PTH-peptid hatására azonos mértékben nőtt a femur distalis szakaszának ásványianyag-sűrűsége (BMD), valamint (μ CT vizsgálat alapján) ezen régió és a csigolyák csontállományának térfogata, a trabekulák vastagságával együtt, továbbá a femur középső szakasz kéregállományának endostealis felszínén zajló appozicionális csontképződés. A [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-34) analóg és a hPTH(1-34) hatására gyorsabb ütemben nőtt a femur distalis szakaszának csontsűrűsége, illetve nagyobb volt a teljes csontváz csontsűrűségének, illetve a proximalis tibia-szakasz trabekuláris térfogatának növekedése, mint [Gly¹,Arg¹⁹]hPTH(1-28) analóg adása után.

Megállapították, hogy a PTH szivacsos csontállományon érvényesülő anabolikus hatásainak legfőbb eleme a cAMP/PKA jelzőrendszer, míg a PTH(29-34) szekvenciával összefüggésbe hozható PLC-független PKC-jelzőrendszer feltehetően a trabekuláris válaszreakciót gyorsítja, illetve egyes régiókban növeli a csontsűrűséget. A PLC-függő PTH1R-jelzőrendszernek nincs szerepe az intermittáló PTH(1-34) kezelés anabolikus csonthatásában.