**Dr. Robert László professzor (Paris),**

**a Magyar Tudományos Akadémia külső tagja tartott nagy érdeklődéssel kísért előadást az öregedéssel összefüggő sejtélettani mechanizmusokról a Baráti Kör 2006. május 31-i klubdélutánján. a II. sz. Gyermekklinika. tantermében. A kiemelkedően tartalmas előadás szerkesztett változatát közöljük honlapunkon, hogy azok az érdeklődő barátaink is elérhessék, akik nem tudtak résztvenni az összejövetelen. Szívből köszönjük Professzor úrnak megtisztelő együttműködését!**

**Prof. emer. Dr. Monos Emil,**

**a Baráti Kör elnöke.**

Az öregedés celluláris és molekuláris mechanizmusai:

A Verzár Frigyes által javasolt epigenetikus - poszttranszlációs módosulások jelentősége.

*L. Robert, Laboratoire de Recherche Ophtalmologique, Hôtel Dieu, Université Paris V, 1 place du parvis Notre Dame, 75181 Paris Cedex 04, France*

Az öregedéssel kapcsolatos kutatás első éveiben a 19. századtól kezdve a legtöbb munka a megfiatalításra vagy legalábbis az öregedés lelassítására irányult. Példaképpen említhetjük a francia endokrinológus, Brown-Sequard kísérleteit, aki önmagának állati here-kivonatot fecskendezett be és azt állította, hogy ez szexuális képességeit fokozta. Mivel vizes kivonat volt, tesztoszteron nem lehetett benne. Az egyetlen komoly munka, amit McCay közölt a harmincas években, kimutatta, hogy kalória-szegény diétán tartott patkányok tovább élnek. Ez a metódus (CR-caloric restriction) még ma is egy fontos kutatási irány. - Az első komoly kísérletet, ami megalapozta a kísérleti gerontológiát, Verzár Frigyes végezte és közölte az 1950-es években, a patkányfarok kollagén rostjainak az öregedéséről. Ezen ábra mutatja Verzár kísérleti berendezését: az ín-rost egy kontrollált hőmérsékletű vízfürdőben van felfüggesztve. 37°C fölé melegítve a kollagén rost denaturálás folytán megrövidül. Egy megfelelő ellensúly ezt meg tudja akadályozni. Ez a súly exponenciálisan nő a patkány korával, mint mutatja ezen ábra (kor hónapokban az abszcisszán, a súly g-ban az ordinátán). Verzár logikusan proponálta, hogy ez a kísérlet azt mutatja, hogy a kollagén rostok keresztkötései exponenciálisan szaporodnak a korral. Ez még ma is igaz. Amit akkor (az ötvenes, hatvanas években) még nem lehetett tudni, hogy a növekedés-fejlődés alatt létrejövő keresztkötések száma csak a fejlődés végéig szaporodik. Utána egy új mechanizmus jön létre, ami az élet végéig növeli a keresztkötések számát. Ezt, az akkor még nem ismert folyamatot a Maillard reakcióval lehet magyarázni. Maillard, egy francia kémikus a 20-ik század elején a nem enzimatikus glikációnak vetette alapját. Ez a reakció magyarázza a keresztkötések növekedését. Ez egy nem természetes, de kémiailag magától értetődő reakció, egy redukáló cukor (aldehid) és egy amino csoport között, ami az Amadori átrendeződés után több, komplikált policiklikus molekulához vezet, melyeket gyűjtőnéven "Advanced glycation End Product"-nak (vagy rövidítve AGE-nek) neveznek. Több ilyen AGE felelős a kollagén és más fehérjék keresztkötésekkel való megváltoztathatóságáért. Ennek kiderítése évtizedekig tartott. Már a fiziológiás keresztkötések biológiája is bonyolult, mint mutatja ezen ábra. Ezt a folyamatot a lizinoxidáz katalizálja, egy réz (Cu++) tartalmú enzim, de aminek a szerepe a fejlődés végén megszűnik. Ezen ábrán lehet látni a redukálható lizin eredetű fiziológiai keresztkötő aminosavak emelkedését és csökkenését, amit követ a "hexitol lizin"-ek folyamatos növekedése. Ez a Bailey-től kölcsönvett ábra (Fig. 7) világosan mutatja a fiziológiás keresztkötések folyamatát, amit követ a Maillard reakció által létrejött glikációs keresztkötések szaporodása. Ez a séma csak egy útját mutatja a reakciónak, ami a glukóz és az aminocsoport reakciója után keresztkötéshez vezet. Ezen keresztkötések megakadályozzák a fehérje lebomlását és így megállítják a felújulásukat (turn-over). Több más AGE-molekula lett izolálva és karakterizálva, mint mutatja ezen ábra. Az AGE-k a nukleotida bázisokkal is tudnak reagálni és így mutációkhoz vezetni. Újabban ki lett mutatva, hogy az AGE-k többféle receptorról tudnak reagálni: RAGE (receptor for AGE) és többféle káros reakciót megindítani, közöttük a szabad gyökök termelése talán a legfontosabb. Ezen aktív oxigén fajták (ROS: reactive oxygen species) oxidációs láncreakciókat tudnak indítani és így hozzájárulni az öregedéssel járó sejt és szövet módosulás kialakulásához. Ezen ábra mutatja eme káros reakciók legfontosabbjait, közöttük a mutációk előidézését. Mi ki tudtuk mutatni, hogy AGE-k fibroblaszt sejttenyészethez adva erősen megnövelik a sejthalált. Ezen reakciókat is a RAGE-k közvetítik. Fontos itt megjegyezni, hogy a glukóz egy fontos, energiát produkáló anyagcsere termék és elméletileg csak genetikailag kontrollált anyagcsere pályákat szabadna követnie, hogy energiát, ATP-t termeljen. A glikációs reakciót, ami teljesen logikus kémiailag, a "természet" nem látta előre és semmiféle védőmechanizmusról nem gondoskodott. Ez egy klasszikus példája a posztszintetikus (epigenetikai, poszttranszlációs) reakcióknak, amik nincsenek a génekben kódolva, bár semmiképpen sem sztochasztikusak, teljes mértékben előreláthatóak, de a fejlődés folyamán semmilyen védőmechanizmus nem alakult ki, hogy óvja a szervezetet ezen reakciók káros hatásaitól. Így világossá válik, hogy Verzár felfedezése a kollagén öregedésével kapcsolatban egy széria fontos és érdekes új eredményhez vezetett, ami sajnos nem akadályozta meg, hogy Verzár nevét a legtöbben elfelejtik idézni idevonatkozó munkáikban. Kiderült a kutatások folyamán, hogy több más, öregedésben fontos szerepet játszó reakció szintén posztszintetikus nívón játszódik le, a gén programtól függetlenül. Például kiderült, hogy a belélegzett oxigénnek kb. 5%-a szabadgyök termelésben vesz részt és így nem vesz részt a sejtek energia termelésében, sőt, káros reakciókat okoz. Ebben az esetben is a védőmechanizmusok (ROS-scavanger) elégtelenek és nem tudják a szervezetet megfelelően védeni, nem elég hatásosak. Kísérletezéseink folyamán több hasonló mechanizmust fedeztünk fel, mind posztszintetikus folyamatban lépnek fel és okoznak károkat. Sőt, pozitív (feedback=visszacsatolás) visszacsatolós mechanizmussal autoamplifikációs természetük révén a korral mind károsabbá válnak. Több példát fogunk említeni, elsőnek a fibronektint és utána az elasztint. - A fibronektin egy banánszerű molekula (Fig. 19), 2 hasonló, de nem identikus peptidláncból áll. Az alapegységei sejtreceptorokkal reagálnak, az integrinekkel és mások az extracelluláris mátrix más makromolekuláival, kollagénnel, proteoglikánnal és így "szkocs-szalg"-szerűen rögzítik a sejteket az extracelluláris mátrixhoz. Nejem munkája alapján ki lett mutatva, hogy a fibronektin bioszintézise fokozódik a korral. Ugyancsak kiderült, hogy a fibronektint gyorsan megtámadja több proteáz, úgy a vérplazmában, mint az érfalban, ahol a fibronektin mennyisége az arterioszklerotikus lerakódásokban, túlszintézis következtében erősen megnövekszik. Transzkonformáció következtében kriptikus kötések megtámadhatóvá válnak és proteolízis által többféle, elég magas molekulasúlyú peptid keletkezik. A polinukleáris leukocitaelasztáz ebben a folyamatban fontos szerepet játszik, de más proteázok is közreműködnek. Több ilyen peptidről kiderült, hogy káros hatásúak. Egy nagy peptid például proteolitikus tulajdonsággal rendelkezik, dacára, hogy a fibronektin nem proteáz. Egy másik peptid serkenti a rosszindulatú sejtváltozást. Van peptid, amelyik gyulladást idéz elő az izület porcogójában és olyan, amelyik serkenti a fibronektin bioszintézisét. Így létrejön egy valóságos végtermék-gátló folyamat, "circulus vitiosis" (Fig. 22), ami autoamplifikálódik a korral és erősen hozzájárul a sejt és szövet öregedéshez. A következő példa az elasztin öregedését ábrázolja. Az elasztikus rostok a korral fragmentálódnak, az elasztázok (mint például a leukocita elasztáz, MMP-2 és MMP-9 és mások) helyenként lebontják a folyamatos rostokat és elasztin peptideket termelnek. Ennek egyik oka az elasztin rostoknak a korral járó kalcium és lipid felvétele. Az elasztin struktúrája lehetővé tesz egy erős affinitást a Ca-hoz és többféle lipidhez, mint mutatja ezen ábra (Fig. 24). Hozzájárul ehhez, hogy a korral az elasztáz típusú proteáz termelés erősen amplifikálódik (Fig. 25). A lipoproteinek közül az LDL és a VLDL, de nem a HDL, ugyancsak serkentik az elasztáz termelést. Így a korral az elasztáz termelés növekszik és ezáltal az elasztikus rostok fragmentációja. Egy Eliza metódussal meg tudtuk határozni a vérben keringő elasztin peptidek koncentrációját (Fig. 26) kb. 2000 férfinél és nőnél. A középérték kb. 10 microgramm/ml, egy aránylag magas koncentráció. Ezen peptidek reagálnak az általunk leírt elasztin receptorral, amit mutat ezen kép, a 3 alapegységgel és a reakciókkal, ezen receptor közvetítésével. A következő ábra (Fig. 28) egy hexapeptidet mutat; VGVAPG, egyike az elasztin receptor agonistáinak. A következő ábra mutatja (Fig. 29), hogy emelkedő elasztin peptid koncentráció hozzáadása egy fibroblaszt kultúrához erősen fokozza az elasztáz termelést. Ezt egy diszaharida, a melibióz (és a laktóz is) gátolja, mert reagálnak az elasztin receptoron lévő lektinkötés pontjával, ami lecsökkenti az elasztint felismerő pontok affinitását az elasztin peptidekhez. Ennek érdekes biológiai alkalmazásai vannak. Kiderült szintén munkáink folyamán, hogy az öregedés következtében az elasztin receptor elveszti hasznos tulajdonságait és csak a káros tulajdonságai maradnak meg. Ezen az ábrán (Fig. 30) látható a korral járó csökkenése a kalcium mobilizációs reakciónak, amit az elasztin peptidek a PMN leukocitákhoz való hozzáadása idéz elő. Erősen csökken a korral az intracelluláris kalcium mobilizálása és lelassul a normális intracelluláris kalcium koncentráció visszanyerése. Ez még fokozódottabb hiperlipidémiás atheroszklerotikus betegek sejtjeivel. Hasonló változásokat találtunk egy másik receptorral ugyanolyan sejteken, amelyek egy baktérium peptidet, az FMLP-t ismernek fel. Ezen receptort használtuk egy gerontológia kórház betegeinél, akik között sokan előrehaladott kóros állapotban voltak; PMN sejtjeiket FMLP-vel inkubálva kiderült, hogy egyes betegek sejtjei már nem tudják normalizálni a felemelkedett intracelluláris kalciumot, ami vagy magas szinten maradt vagy tovább emelkedett. Ez azt mutatja, hogy ezen betegek sejtjei, a PMN leukocitái már nem képesek a fertőzést okozó baktériumok ellen harcolni, a baktériummal való kontaktus révén ezen sejtek elpusztulnak. Ezzel szemben a kórházi laboratóriumban véghezvitt fehérvérsejt számolás normális számot adott. Tehát egy "normális" szám nem jelent egy normális funkciót. Ezen ábra (Fig. 31) 2 másik példáját mutatja az elasztin receptor öregedésének, a receptor szétkapcsolását. A baloldali kép mutatja, hogy az elasztin peptidnek hozzáadása szabadgyök (szuperoxid) termelést vált ki a monocitákból. Ezen reakció gátolható Pertussis toxinnal, ami a G proteint gátolja, amelyik az elasztin receptor aktiválását közvetíti a sejtek (belseje) felé. Öregebb eredetű monocitáknál emelkedik a szabadgyök termelés elasztin peptid hozzáadásától, de ezen sejteknél a Pertussis toxin hatástalan. Tehát öregedés folyamán az elasztin receptor lekapcsolódott a normális szignál átadási pályájáról és ennek következtében a szabadgyök termelése emelkedett és továbbá nem kontrollálható a receptor gátlásával. A kép jobboldali része az elasztin receptor egy másik érdekes kóros elváltozását mutatja. Monociták lettek inkubálva 14C acetáttal és koleszterol szintézis lett mérve. Kiderült, hogy az elasztin receptor aktiválása fiatal sejtekben a koleszterol szintézisét gátolta. Ezen gátlás az elasztinpeptid koncentráció emelkedésével nőtt. Viszont idős emberek sejtjei ezt a gátlást nem tudták keresztülvinni. Ismert is, hogy a vérplazma koleszterol tartalma emelkedik a korral. A következő kísérlet érfal endotéliás sejtekkel lett elvégezve (Fig. 32). Ezen sejtek exprimálják az elasztin receptort, amint ez kiderült immuno rhodaminos jelzés alapján. Elasztin peptidek hozzáadása után az intracelluláris szabad kalcium felemelkedik, a receptor aktiválása révén. Kimutattuk, hogy az endotél sejtekben az elasztin receptor kapcsolódik az NO-t termelő mechanizmushoz. (Az elasztin receptor kapcsolva van az NO szintetáz komplexumhoz). Ezt úgy lehet kimutatni, hogy patkány aorta gyűrűkhöz Ringer oldatban elasztin peptideket adunk. Ez egy koncentrációtól függő vazorelaxációt vált ki, ha előtte az aortagyűrűt noradrenalinnal (epinephrinnel) kontraktáljuk. Ezen egyenes mutatja a vazorelaxáció intenzítását az elasztin peptid koncentráció függvényeként (Fig. 33). Mikor ezen kísérlet fiatal és öregedő állatok aortájával lett mérve, kiderült, hogy az újszülött patkánynál ezen reakció még nem idézhető elő. Maximális lesz a fiatal, de felnőtt állatnál és aztán a kor függvényeként csökken és az öreg állatnál már nem mutatható ki (Fig. 34). Már rég tudjuk, hogy a korral a vérnyomás (szisztolikus és diasztolikus) emelkedik. A legmeglepőbb bizonyítékát az elasztin receptor káros hatásának a limfocitákkal lehetett kimutatni. Elasztin peptidekkel inkubálva a "memory" és "helper" limfociták exprimálják a receptort (az elasztin receptorok expressziója indukálható) (Fig. 35). Ha elasztin peptideket emelkedő koncentrációban adjuk a tenyészethez, a limfociták gyorsabban szaporodnak egy bizonyos peptidkoncentrációig és aztán ez a hatás csökken. Ezzel párhuzamosan ezek a sejtek egy szerin elasztázt is szintetizálnak és egyidőben az elhalt sejtek is megjelennek a peptid koncentráció emelkedésével. Kisebb elasztin peptid koncentrációnál nekrotikus, magasabb koncentrációnál apoptotikus a sejthalál (Fig. 36). Tehát, egy "normálisan" jelenlévő receptor, az elasztin receptor, egészséges sejtekben elasztin peptidek jelenlétében sejthalált tud előidézni! Ki tudtuk mutatni, hogy az atheroszklerotikus léziókban lévő mononukleáris sejtek, limfociták, monociták, exprimálják az elasztin receptort és így valószínűleg részt vesznek a lézióban előidézett sejthalálban (Fig. 37). Tehát, itt is az elasztin esetében is rajzolhatunk egy "circulus vitiosust" (Fig. 38), ahol az előbb leírt reakciók autoamplifikációs úton meggyorsítják az elasztint-tartalmazó szövetek (érfal, bőr, tüdő) öregedését. Összefoglalva, az eddig leírt reakciók mind posztszintetikus, poszttranszlációs nívón működnek és nincsenek gén kontroll alatt. Viszont valószínű, hogy ezen molekuláris módosulások kihatnak a gének regulációjára és így genetikus-epigenetikus poszttranszlációs interakciók jönnek létre, melyek láthatóan fontos szerepet játszanak az öregedés biológiájában. Ezen reakciók közé sorolhatjuk a Maillard reakciót, a proteolitikus peptid képződést a káros hatásokkal és az elasztin receptor a szétkapcsolás által előidézett káros reakcióit. Mindezen folyamatok közös tulajdonsága az önfelgyorsuló visszacsatolós mechanizmus. Ez annál is fontosabb, mert az átlag életkor erősen meghosszabbodott és talán még hosszabbodni fog. Így az öregedéssel járó patológiák is szaporodni fognak. Az egyetlen előnye a poszttranszlációs mechanizmusoknak, hogy könnyebben lehet gyógymódot találni ellenük, mint a gén eredetű betegségek ellen. Ezzel viszont a gyógyszeripar nem nagyon foglalkozik.

A konklúziók a következők: az epigenetikus, poszttranszlációs reakciók fontos szerepet játszanak az öregedésben és az öregedéssel kapcsolatos betegségek keletkezésében. Verzár felfedezése a kollagén öregedésével kapcsolatban az első példája ezen folyamatoknak, melyek egyáltalán nem sztochasztikusak, aránylag egyszerű kémiai reakciók, előreláthatóak és megérthetők, de a fejlődés folyamán semmiféle védőmechanizmus nem jött létre ellenük. Így álltak elő az öregedéssel járó és az öregedést megnehezítő betegségek, mint például a II. típusú cukorbaj és szív-ér betegségek (athero-arteriosclerosis). Munkáink folyamán több ilyen poszttranszlációs reakciót írtunk le és kimutattuk az önamplifikált visszacsatolós reakció mechanizmusát. Nem vitatható, hogy Verzárral való hosszú barátságom és kapcsolatom erős stimulus volt munkáim kifejlesztésében.