

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az orbita fibroblastok szerepe az endocrin orbitopathia
pathogenesisében**

Galgóczi Erika

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. Az endocrin orbitopathia epidemiológiája	9
3.2. Az endocrin orbitopathia klinikai tünetei és stádiumbeosztása.....	10
3.3. Az endocrin orbitopathia pathomechanizmusa	11
3.3.1. Az orbita fibroblastok szerepe.....	11
3.3.2. A hialuronan szerepe	14
3.3.3. A plazminogén aktivátor inhibitor-1 szerepe	18
3.3.4. A transzformáló növekedési faktor béta.....	20
3.3.5. A 4-metilumbelliferon.....	21
3.4. Az endocrin orbitopathia diagnosztikája	22
3.5. Az endocrin orbitopathia immunológiai aktivitása	23
3.6. Az endocrin orbitopathia kezelése	24
4. Célkitűzések	28
5. Módszerek	29
5.1. Primer fibroblast sejtvonalak létrehozása.....	29
5.2. Sejtproliferációs vizsgálat	32
5.3. Metabolikus aktivitás vizsgálat	33
5.4. Citotoxicitás vizsgálat	33
5.5. Kaszpáz aktivitás mérés	34
5.6. PAI-1 fehérje és HA mennyiségének meghatározása a felülúszóban	34
5.7. Polimeráz láncreakció (PCR)	35
5.8. Statisztikai feldolgozás.....	36
6. Eredmények	37
6.1. A sejtdenzitás hatásának vizsgálata a PAI-1 és HA termelésre.....	37
6.2. TGF- β kezelés hatása a fibroblastok PAI-1 és HA termelésére	44
6.3. 4-metilumbelliferon kezelés hatása a fibroblastok HA termelésére	50
6.4. 4-metilumbelliferon és TGF- β kezelés együttes hatása.....	60
7. Megbeszélés.....	62
8. Összefoglalás	70
10. Irodalomjegyzék	72
11. Tárgyszavak.....	81
12. Keywords.....	81

13. Köszönetnyilvánítás.....	82
14. Függelék	83

1. Rövidítések jegyzéke

4-MU – 4-metilumbelliferon

4-MUG – 4-metilumbelliferil-glükoronid

^{99m}Tc -DTPA-SPECT – ^{99m}Tc -diethylentriamin-pentaecetsav SPECT

BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridin

CAS – clinical activity score – klinikai aktivitás pontszám

CD44 – cluster determinant 44- sejtfelszíni antigén 44

cDNS – komplementer dezoxiribonukleinsav

CRY61 – cysteine-rich angiogenic inducer 61 – gyulladást/fibrosist fokozó cisztein-gazdag angiogén induktor 61

CT – komputertomográfia

CTGF – connective tissue growth factor - kötőszövet növekedési faktor

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 – citotoxikus T-lymphocytá antigén 4

DMSO – dimetil-szulfoxid

ECM – extracelluláris mátrix – sejtközötti állomány

EOP – endocrin orbitopathia

EUGOGO – European Group of Graves' Orbitopathy

FBS – fetal calf serum– magzati borjú szérum

G6PD – glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

GAG – glükozaminoglikán

GAPDH – gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GD – Graves-Basedow kór

GlcA – D-glükoronsav

GlcNac – N-acetil glükózamin

GO – Graves' ophthalmopathy – Graves' ophthalmopathia

HA – hyaluronan – hialuronan

HARE – hyaluronan receptor for endocytosis - hialuronan endocitózis receptor

HAS – hyaluronan synthase – hialuronan szintáz

HLA – human leukocyte antigen – humán leukocytá antigén

HYAL – hyaluronidase – hialuronidáz

IFN- γ – interferon- γ

IGF-1R – insulin-like growth factor 1 receptor – inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor

IL-2 – interleukin-2

IL-4 – interleukin-4

IL-10 – interleukin-10

IL-12 – interleukin-12

LI90 – ito cell line – máj csillagsejtek

LYEV-1 – lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor - nyirokrendszeri endothelialis hialuronan receptor

MHCII – major histocompatibility complex II – fő hisztokompatibilitási komplex II

MMF – mikofenolát mofetil

MMI – methimazol

MMP – matrix metalloproteinase – mátrix metalloproteináz

MRI – mágneses rezonancia-képalkotás

NO – nitrogén-monoxid

OF – orbita fibroblast

PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1 – plazminogén aktivátor inhibitor 1

PBS – phosphate buffered saline – foszfát pufferelt sóoldat

PCR – polymerase chain reaction - polimeráz láncreakció

PDGF – platelet-derived growth factor - vérlemezke eredetű növekedési faktor

PTPN22 – protein tyrosine phosphatase, non-receptor type – nem receptor típusú protein tirozin foszfatáz 22

PTU – propylthiouracil

RHAMM – receptor for hyaluronan mediated motility - hialuronan által közvetített motilitás receptor

RTX – rituximab

SLE – szisztémás lupus erythematosus

SPECT – single photon emission computed tomography – egyfoton-kibocsátásos, számítógépes metszeti képalkotás

TCZ – tocilizumab

TGF- β – transforming growth factor- β – transzformáló növekedési faktor- β

Th₁ – T-helper 1 lymphocyt

Th₂ – T-helper 2 lymphocyt

Thy-1 – thymocyte antigen – timocyt

TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinases – szöveti metalloproteináz inhibitor

TLR-4 – toll like receptor-4

TNF- α – tumor necrosis factor - α – tumor nekrozis faktor- α

tPA – tissue plasminogen activator – szöveti plazminogén aktivátor

TPO – thyroid peroxidase – pajzsmirigy peroxidáz

TRAb – TSH receptor autoantibodies – TSH receptor antitest

TSH – thyroid stimulating hormone – pajzsmirigy stimuláló hormon

UDP – Uridine-diphospho-glucose – uridin-difoszfát-glükóz

UDP – GlcA – uridin-difoszfo-glükoronsav

UDP – GlcNac – uridin-difoszfo-N-acetil-glükózamin

UGT – Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase – UDP glükoronozil transzferáz

UH – ultrahang

uPA – urokinase plasminogen activator – urokináz plazminogén aktivátor

2. Bevezetés

Az endocrin orbitopathia (EOP) a Graves-Basedow (GD) kóros betegek 20-30 %-ában jelenik meg, és az orbita szövetek autoimmun gyulladásos és szerkezetének átrendeződése jellemzi (1). A betegek többségében a külső szemizmok megvastagodása és a zsíros kötőszövet felszaporodása jellemző; néhány esetben csak az egyik, vagy a másik folyamat dominál (1). Az EOP klinikai képét a csontos orbitában található szövetek térfogat-növekedése okozza. A periorbitalis oedema, a duzzadt izmok és kötőszövet és a csontos orbita közötti térfogatbeli eltérés eredményeként a szövetek az orbita frontális nyílása felé „tolódnak”, ami előidézi a szem axialis protrúzióját. A látást közvetlenül veszélyeztető keratitis megjelenhet súlyos és hosszantartó proptosis esetén, míg a látóideg neuropathiáját a látóideg kompressziója okozza (1, 2). Az autoimmun folyamat elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblastok (3), amelyeket az infiltráló immunsejtek, illetve az általuk termelt citokinek és növekedési faktorok aktiválnak. Ennek a folyamatnak az eredménye a fibroblastok fokozott proliferációja és hialuronan (HA) termelése (4), ez utóbbi eredményeként az extracelluláris mátrix (ECM) átrendeződése. Később az érett adipocytává történő differenciálódás irányába megy a folyamat. A plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) szerepe, mely csökkenti az ECM komponenseinek degradációját és ezáltal növeli a mátrix stabilitását, az EOP pathogenesisében nem volt ismert (4). A folyamat a kontakt gátlás feloldásával hozzájárulhat a proliferáció fokozódásához is. A HA termelés meghatározó faktora a EOP pathogenesisének; a HA vízkötőképessége *in vitro* saját tömegének akár ezerszerese (5). Minden olyan beavatkozás, ami csökkenti a helyi HA termelést, csökkentheti az orbitában kialakuló térfogat-növekedést, és ezzel beavatkozhat a EOP pathogenesisébe. A 4-metilumbelliferont sikeresen használják állatmodellben, autoimmun, krónikus gyulladásos és daganatos betegségekben (6) a HA termelés csökkentésére. Gyógyszerként, mint spazmolitikum, Európában számos országban elérhető.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az endocrin orbitopathia epidemiológiája

Az endocrin orbitopathia autoimmun pajzsmirigy betegségekhez, leggyakrabban Graves-Basedow kórhoz társuló kórkép (1). Általában hyperthyreosis mellett alakul ki, de ritkán euthyreoid állapotban vagy hypothyreoid krónikus autoimmun thyroiditis mellett is előfordul (1). A szakirodalomban más néven is ismert: thyroid associated orbitopathy (pajzsmirigy betegséghez társuló orbitopathia, TAO), Graves' ophthalmopathy (GO – Graves' ophthalmopathia), thyroid eye disease (TED, pajzsmirigybetegséget kísérő szembetegség) (7). Az EOP – a praetibialis myxoedema mellett – a másik gyakori extrathyreoidális manifesztációja a GD-nak, jellemzően az orbita kötőszövet felhalmozódásával és a külső szemizmok megvastagodásával jár (1, 7). A GD esetek 30 %-ában alakul ki manifeszt EOP (8), bár a súlyos formája csak az esetek 3-5 %-ában jelentkezik (9, 10). Incidenciája 5-10 / 100 000, és a kaukázusi népcsoportokban gyakoribb, mint az ázsiai rasszokban (11). Nők esetében nagyobb a kialakulás kockázata (nő:férfi arány 2:1), míg a férfiakra a súlyosabb forma jellemző. Nők esetében a 40-60 év közötti életszakasz jelent nagyobb kockázatot (12). Ismert gének, amelyek kapcsolatot mutatnak a betegség kialakulásával, az immunitást szabályozó gének, a humán leukocytá antigén (HLA)-DR β 1-Arg, a citotoxikus T-lymphocytá antigén (CTLA)-4, a nem receptor típusú protein tirozin foszfatáz 22 (PTPN22) és a CD40. Ezen gének egyike sem növeli több mint négyszeresére a kialakulás kockázatát, de fontosak a betegségben (13, 14).

3.2. Az endocrin orbitopathia klinikai tünetei és stádiumbeosztása

A betegség korai, ugyanakkor legfőbb és leggyakoribb tünete a retrobulbáris fájdalmas nyomásérzés, amely súlyosan rontja a betegek életminőségét (15). A fájdalomérzet oka a felszaporodott kötőszövet, a megvastagodott szemizmok és a megnövekedett intraorbitalis nyomás (16). A beteg vizsgálata során kettőslátás, fokozott könnyezés, fényérzékenység, exophthalmus, a felső szemhéj retractiója, a periorbitalis oedema, a conjunctiva hiperaemiája lehet jelen (1, 7, 14). A GD további extrathyreoidealis manifesztációi a praetibialis myxoedema és a kézujjakat érintő acropathia, melyek ritkábban jelentkeznek, és általában súlyos EOP-hoz társulnak (1, 17).

Az EOP klinikai megnyilvánulásának felmérésére számos osztályozási rendszert vezettek be. 1969-ben a Werner megalkotta a NOSPECS klasszifikációt, majd 1977-ben módosította azt. Ez a rendszer csak az EOP klinikai tüneteinek súlyosságát vette figyelembe, nem tett különbséget az immunológiailag aktív és a inaktív szakasz között (18). Egészen 1989-ig a kezelés megválasztásánál csak a tünetek súlyosságát vették figyelembe. Az aktivitás megítélésére a CAS (1.táblázat) alkalmas; ha az értéke 4 vagy annál nagyobb, az immunológiailag aktív betegségre utal (19). További kétféle, a NOSPECS helyett alkalmazható módszer áll a rendelkezésünkre az EOP súlyosságának leírására: a VISA és a EUGOGO klasszifikáció. Az előbbit inkább Észak-Amerikában, míg az utóbbit Európában alkalmazzák (10). A VISA klasszifikációt 2006-ban alkották meg. A jelenlegi verziója 4 súlyossági paramétert alkalmaz: V (vision - látás), I (inflammation - gyulladás), S (strabismus - kancsalság), és A (appearance - megjelenés). Minden egyes jellemzőt egymástól függetlenül értékelnek, és maximálisan 20 pont adható a rendszerben (20). A European Group of Graves Orbitopathy (EUGOGO) négy súlyossági csoportot különböztet meg (enyhe, közép súlyos, súlyos, látásvesztéssel fenyegető) (10).

Fájdalom	- fájdalom, nyomó érzés a szem mögött az elmúlt négy hétben	1
	- tekintéskor fellépő fájdalom az utóbbi négy hétben	1
Vörösség	- a szemhéjak vörössége	1
	- legalább egy kvadránst érintő conjunctiva diffúz vörösség	1
Duzzanat	- szemhéjak duzzanata	1
	- chemosis	1
	- duzzadt caruncula	1
	- a proptosis fokozódása (>2mm-el) 1-3 hónapos periódus alatt	1
Funkció romlás	-a szemmozgások bármely irányba történt >5° beszűkülése az utóbbi 1-3 hónap alatt	1
	- a visus >1 vonallal történő csökkenése a Snellen táblán (stenoplyukat használva) 1-3 hónapos periódus alatt	1

1. táblázat Klinikai aktivitási ponttáblázat (19). Négy vagy több tünet megléte esetén a folyamat aktív.

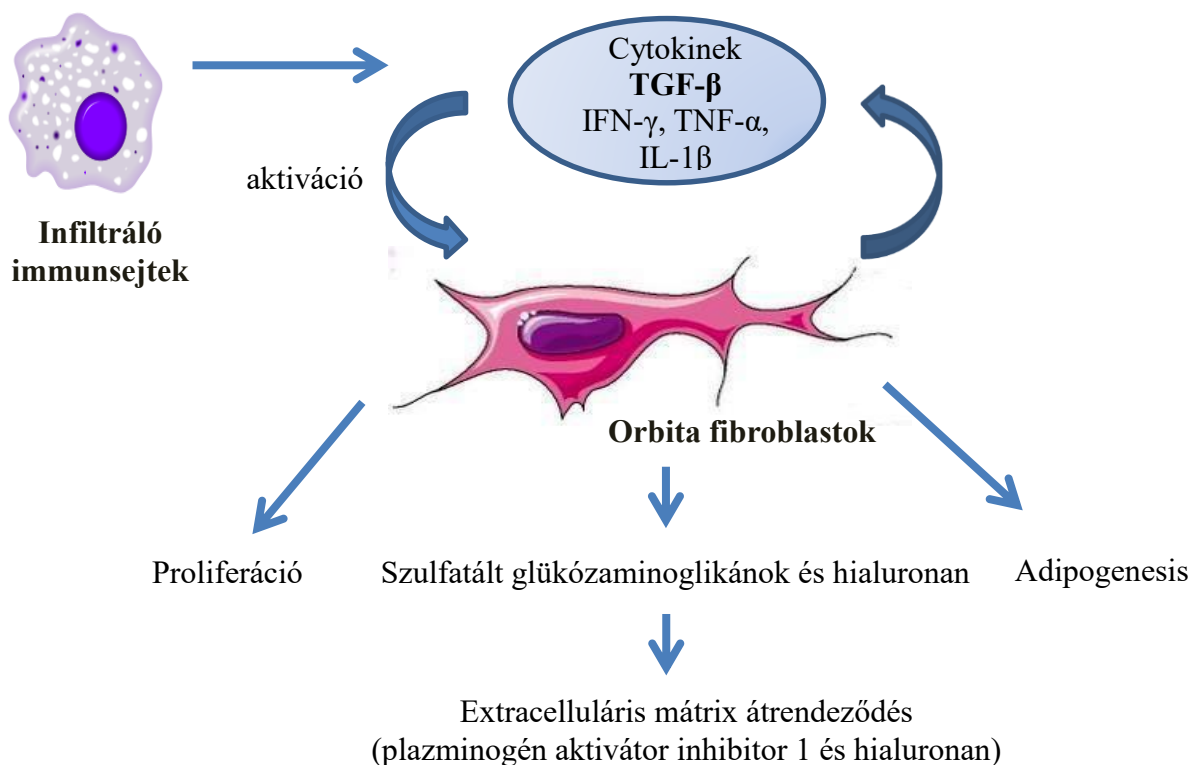
3.3. Az endocrin orbitopathia pathomechanizmusa

3.3.1. Az orbita fibroblastok szerepe

Számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy az orbita fibroblastok (OF) az autoimmun folyamatok elsődleges célpontjai EOP-ban (3, 21-23). Az OF heterogén csoport, és az alapján lehet őket osztályozni, hogy expresszálják-e a felszínükön a CD90 glikoproteint (thymocita antigén-1, Thy-1) (24, 25). A Thy-1 esszenciálisan megtalálható minden izom eredetű OF felszínén, ezzel ellentétben az orbita kötőszövet állományának csak mintegy 30 %-a Thy-1 pozitív (24). A Thy-1⁺ sejtek az orbitában lejátszódó immunfolyamatokra HA termeléssel válaszolnak, illetve képesek adipogenesis irányába differenciálódni (26). Az adipogenesis maga nem befolyásolja a Thy-1 expresszióját, és kultúrában az EOP OF-ok nagyobb mennyiségben expresszálnak Thy-1-et, mint a kontroll OF-ok (27).

Az EOP korai aktív szakaszára jellemző, hogy az orbita szöveteit mononukleáris sejtek infiltrálják, főleg CD4⁺ T-lymphocyták, CD8⁺ T-lymphocyták, monocyták, macrophágok,

B-lymphocyták és plazmasejtek (1, 7, 28, 29). Az infiltráló CD8⁺ T-immunsejtek képesek felismerni az OF-okat, és aktiválódnak a fő hisztokompatibilitási komplex II (MHCII) és a CD40-függő szignalizációs útvonalakon keresztül, alátámasztva, hogy az OF-ok jelentik az autoimmun folyamatok célpontjait (7). A korai aktív fázisban domináló sejteket T-helper 1 (Th₁-) lymphocytáknak nevezzük és olyan cytokineket (interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2), tumornekrózis faktor- α (TNF- α)) termelnek, amelyek elősegítik a sejtmediálta immunválasz kialakulását (30, 31). A betegség későbbi fibroticus szakaszában pedig hízósejtek jelennek meg (2, 32), továbbá a T-helper 2 (Th₂) lymphocyták és a hozzájuk köthető cytokinek (interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10)) dominálnak, alátámasztva azt a hipotézist, mely szerint a Th₂-típusú cytokinek a krónikus gyulladásos folyamatokban és a fibrosisban jelentős szerepet töltenek be (30). Az OF-ok aktivációja történhet a pajzsmirigy stimuláló hormon receptor ellenes antitestekkel (TRAb) illetve az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptoron (IGF-1R) keresztül (1). Az aktiváció következtében nő az OF proliferációs rátája és HA termelése, gyulladásos faktorokat termelnek, később adipocytává, illetve myofibroblastokká differenciálódnak. Az ECM egyes komponenseinek kóros felhalmozódása, az orbita tartalom átrendeződéséhez vezet (30). Számos cytokint és növekedési faktort mutattak ki az EOP-ban szenvedő betegek orbita szöveteiben (31, 33-35).



1. ábra. Az orbita fibroblastok szerepe az EOP pathomechanizmusában. Az EOP pathomechanizmusa során az orbitában található kötőszövet felhalmozódása az infiltráló sejtek által felszabadított cytokinek fibroblast aktiváló hatásának eredménye. A cytokineket az orbitát infiltráló T- és B-lymphocyták és macrophágok, illetve maguk az aktivált fibroblastok termelik. Az aktiváció eredménye a fibroblastok fokozott proliferációja, az extracelluláris mátrix egyes komponenseinek, a szulfatált glükózaminoglikánok és a hialuronan termelésének fokozódása, az ECM átrendeződése, a fibroblastok adipocytává történő differenciálódása. Ref. (1) nyomán módosítva.

Az orbita fibroblastok fokozott proliferációja, ECM komponenseinek (főleg HA) termelése és adipocytává vagy myofibroblastokká történő differenciálódása határozza meg az orbita szöveteinek térfogat-növekedését (30), amelyet az 1. ábra mutat be. A fibroblastok proliferációja nagyban hozzájárul a szöveti átrendeződéshez és a fibrosis kialakulásához (36), és egyes eredmények szerint az EOP OF alap proliferációs rátája magasabb, mint a kontroll orbita fibroblastoké (37). A CD40-CD154 ligand kapcsolódása a T-lymphocyták és OF között, a különböző cytokinek, növekedési faktorok (IL-4, IGF-1, vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor – PDGF)), transzformáló növekedési faktor β (transforming growth factor- β TGF- β) hatása a proliferációs rátára erősebb az EOP eredetű OF esetében, mint a kontroll OF-nál (23, 37). Az EOP orbita szövetek emelkedett mennyiségű

nem-szulfatált glükózaminoglikánt (GAG), főleg HA-t és kollagént tartalmaznak, melyeket az OF-ok termelnek. A HA az egyik olyan ECM komponens, amely vízkötőképessége révén nagymértékben hozzájárul az orbita szöveteinek térfogatnövekedéséhez. A harmadik tényező az adipogenesis fokozódása. A Thy1⁺ (CD90⁺) orbita fibroblastok képesek érett adipocytává differenciálódni (38, 39).

3.3.2. A hialuronan szerepe

Az EOP lefolyása során megváltozik az ECM komponensek szintézisének és lebontásának egyensúlya az OF aktivációja miatt (40). EOP-ban a HA a legfontosabb GAG az ECM komponensei közül. A HA nagy molekulású poliszacharid, melynek esszenciális szerepe van a sejt-ECM és sejt-sejt közötti kölcsönhatásokban: autokrin módon ugyanazon a sejtfelszínen lévő HA receptorokkal lép kölcsönhatásba, míg parakrin módon kölcsönhatásba lép a szomszédos sejtekkel és az ECM számos más molekulájával (41, 42), ami egy HA molekula esetében több száz sejtet illetve ECM komponenst is jelenthet (43). A kölcsönhatásban résztvevő sejtfelszíni receptorok a CD44 (cluster determinant 44), a hialuronan által közvetített motilitás receptor (receptor for hyaluronan mediated motility - RHAMM), nyirokrendszeri endothelialis hialuronan receptor (lymphatic vessel endothelial HA receptor – LYEV-1), hialuronan endocytosis receptor (hyaluronan receptor for endocytosis – HARE) és a „toll-like” receptor-4 (TLR-4). Ezek a kölcsönhatások három fontos fiziológiai folyamatot mediálnak: a szignál transzdukciót, a pericelluláris „coat” (pericellulárisan elhelyezkedő HA molekulák) kialakítását, és a receptor-mediált internalizációt (42, 44). A kölcsönhatások a HA és a HA-kötő fehérjék között, mint például a versican vagy az aggrecan, stabilitást és flexibilitást adnak a pericelluláris térnek, csakúgy, mint az intracelluláris mátrixnak (45). A CD44-et tekintik a legfontosabb HA receptornak, ez egy multifunkcionális transzmembrán glikoprotein, aminek 4 funkcionális doménje van (46). A HA-CD44 kapcsolat

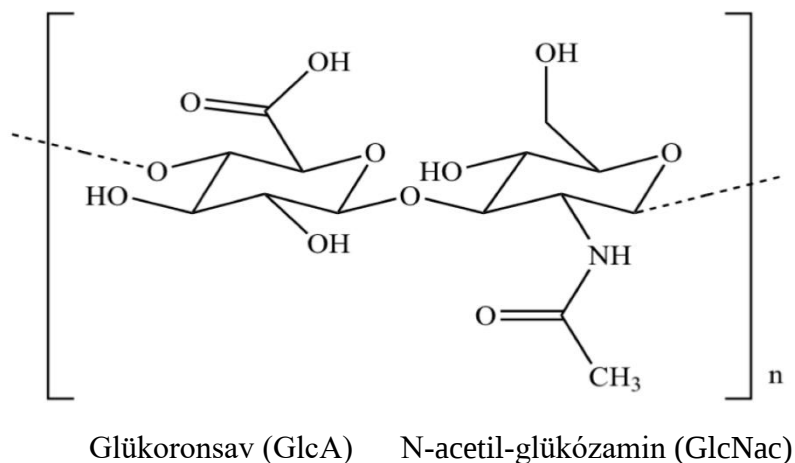
számos feladatot lát el, például a sejt-sejt aggregációban, pericelluláris mátrix retenciójában, a mátrix-sejt és sejt-mátrix szignalizációban, a receptor mediálta internalizációban, a HA lebontásában, és szabályzó szerepe van a sejt mozgásban, illetve a sejt-sejt adhézióban (44, 47). A HA molekula savas, negatív töltésű, nagy molekulásúlyú, ismétlődő alegységekből álló poliszacharid. Két diszacharidból áll: az N-acetil-glükózaminból (GlcNac) és D-glükoronsavból (GlcA) (2. ábra). A HA megadaltonos mérettartományú, tömege 2×10^5 és 10×10^7 Da közé esik, a molekula hosszúsága pedig 2-25 μm . A HA is a sejtmembrán belső felszínén szintetizálódik mint a többi GAG, de fehérje mag nélkül, míg a többi GAG a Golgi apparátusban szintetizálódik és fehérjemagot kap (44). Bioszintézise három transzmembrán glikoziltranszferáz izoenzim által valósul meg: a hialuronan szintáz (HAS) 1,2 és 3 által, és a hialuronidáz (HYAL) 1 és 2 vesz részt a lebontásában (44, 48) (3. ábra). A HA a szintézist követően a pericelluláris térben marad, a szintáz enzimeken keresztül a sejtfelszínhez horgonyozva (4. ábra) vagy sejtfelszíni receptorhoz kötve, egészen addig, míg egy hialuronidáz fel nem szabadítja kötéséből, aminek következtében integrálódni tud az ECM-ba (49).

A bioszintézist végző enzimek egyedülállóak abban a tekintetben, hogy mind a három enzim koordinálja a két glikoziltranszferáz működését: az egyiket a GlcNac-hoz míg a másikat a GlcA-hoz kötik hozzá. Az enzimeket kódoló gének különböző kromoszómákon helyezkednek el: a HAS1 a hCh19-HAS1, a HAS2 a hCh8-HAS2 és a HAS3 a hCh16-HAS3, (sorrendben: 19q13.41, 8q24.12 és 16q22.1 (45)). Katalitikus aktivitás szempontjából $\text{HAS1} < \text{HAS2} < \text{HAS3}$. Ezenfelül a HAS1 és HAS2 nagy molekulásúlyú polimereket szintetizál, míg a HAS3 rövidebb láncúakat hoz létre (50). A HAS1 alacsonyabb aktivitása abból származik, hogy képtelen a HA szintézisre, amennyiben az UDP-glükóz intracelluláris szintje alacsony (51). A szintetizált HA fiziológiai tulajdonságai nagyban függenek a polimer méretétől és mennyiségétől. A nagy koncentrációban lévő nagy molekulásúlyú HA gátolja a sejtnövekedést, míg az alacsony koncentrációban jelenlévő kis molekulásúlyú HA ellenkezőleg hat, továbbá a

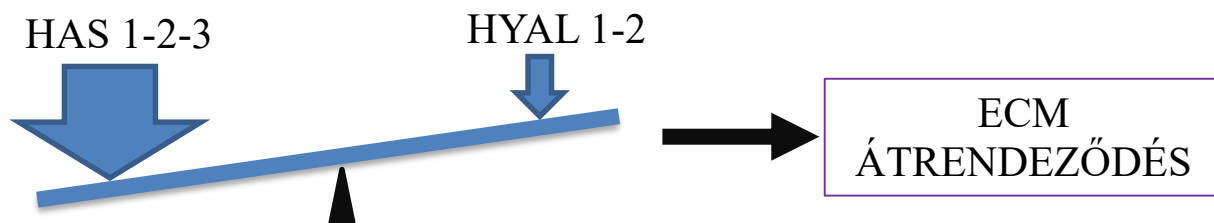
vízkötő képessége is nagyban függ a polimer lánc hosszúságától (50). A HAS1 széles mérettartományban (2×10^5 - 2×10^6 Da) szintetizál HA polimert. A HAS2 az extrém nagy láncokat ($>2 \times 10^6$ Da) szintetizálja, a HAS3 pedig a 3×10^5 Da méretnél kisebb HA polimereket. (52, 53). A termelt HA lebontását a HYAL1 és HYAL2 végzi, kódoló génjeik a 3p21.3 kromoszómán találhatóak (53). Ez a két enzim a $\beta(1-4)$ kötések mentén hasít és diszacharidokat vagy nagyobb fragmenteket választ le a polimerről. A HA lebontását a HYAL2 kezdi meg, majd folytatódik a lysosomában a HYAL1 segítségével. A szöveti sérülés és a gyulladásos körülmények a HA molekula fragmentálódását okozhatják, amit akkor tekintünk fragmentálódásnak, ha a molekulatömege 5×10^5 Da alá csökken (54).

A különböző méretű HA molekuláknak különböző szerepük van. A nagyobb molekulásúlyú HA ($>5 \times 10^5$ Da) anti-inflammatorikus hatású, míg az alacsony proinflammatorikus (55). A HYAL1 és HYAL2 bontja a többi GAG-ot, a kondroitint, kondrotin-4-szulfátot, kondrotin-6-szulfátot és a dermatánt (56) is. A HYAL1 enzim a HA-t a sejten belül bontja le, savas pH-n működik, és ez a fő HYAL a plazmában. A HYAL2 nagyon alacsony hialuronidáz aktivitással rendelkezik a HYAL1-hez képest, és csak a nagy molekulásúlyú HA-t bontja közepes méretű fragmentekre (≈ 20 kDa) (52). A kis molekulásúlyú fragmentekről kimutatták, hogy stimulust jelentenek a rheumatoid arthritises betegek ízületeiben jelenlévő macrophágok bejutásához, és a dendritikus sejtek éréséhez és aktivációjához (57). Emellett a különböző méretű HA fragmentek indukálják a PAI-1, a nitrogén monoxid (NO) és az interleukin 12 (IL-12), illetve más kemokinek szintézisét (58). EOP-ban az OF-ok a cytokinek és antitestek jelenlétére nagy mennyiségű HA termeléssel válaszolnak (1). Hidrofil természetének köszönhetően a HA nagymennyiségű vizet képes megkötni, ezzel is hozzájárulva az orbita kötőszövet térfogatnövekedéséhez (7). A HA termelés meghatározó faktora a EOP pathogenesisének; a HA vízkötőképessége *in vitro* saját tömegének akár ezerszerese (5). Emellett a HA és a

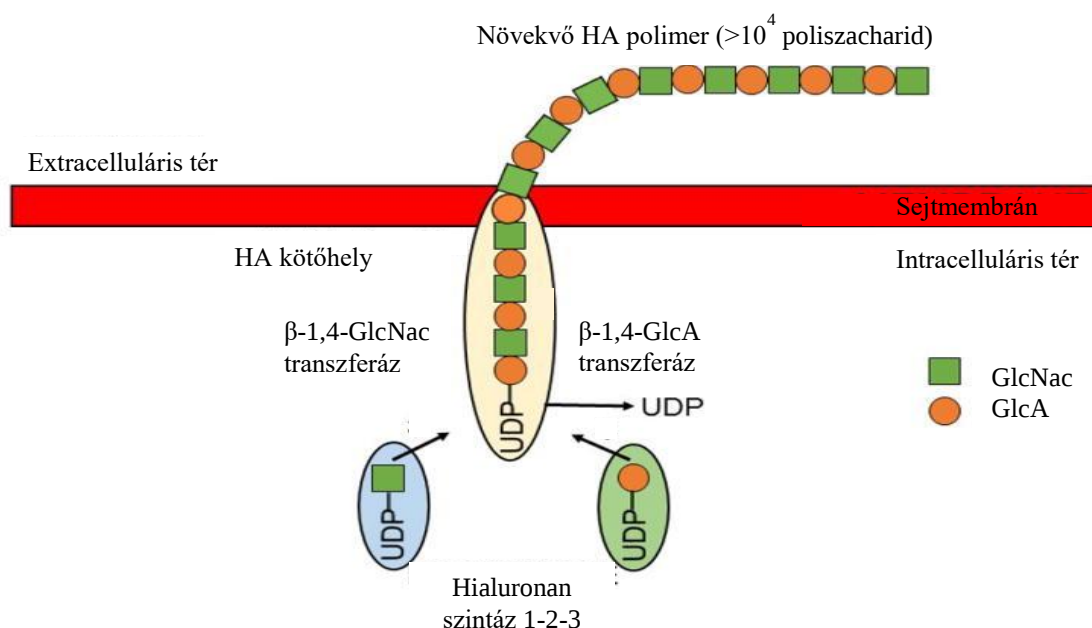
sejtfelszíni receptorok között kialakuló kapcsolat elősegíti a leukocyták infiltrációját a gyulladás helyére (59).



2. ábra. A hialuronan felépítése. A hialuronan az N-acetil glükózamin (GlcNAc) és D-glükoronsav (GlcA) alegységekből épül fel (53).



3. ábra. A hialuronan termelés változása EOP-ban. A hialuronan ciklus egyensúlyát a hialuronan szintázok (HAS) illetve a hialuronidázok (HYAL) tartják fenn. Az EOP-ban ez az egyensúly felbomlik, ami a HA termelés fokozódásához vezet.

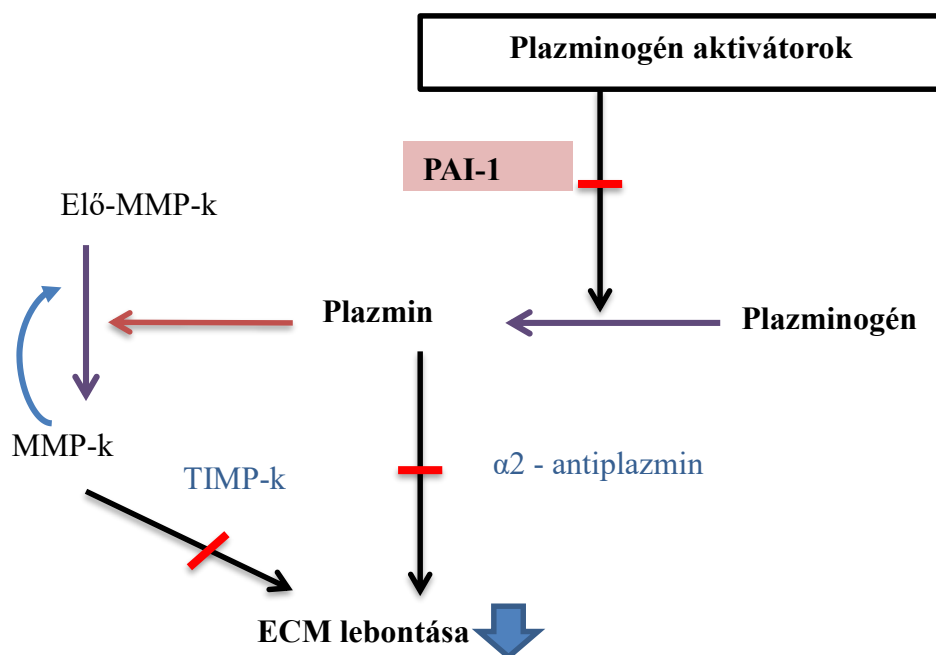


4. ábra. A hialuronan szintézis sematikus ábrája. A membránhoz kötött hialuronan szintáz enzimek uridin-difoszfó-glükoronsav (UDP-GlcA) és uridin-difoszfó-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNac) alegységeket használnak szubsztrátként. A sejtmembrán belső oldalán lévő szintázok által használt UDP-glükóz építőkövek folyamatosan transzlokálódnak az extracelluláris tér felé hosszabbítva a polimer láncát (52).

3.3.3. A plazminogén aktivátor inhibitor-1 szerepe

A plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) szerepe, mely csökkenti az ECM komponenseinek degradációját és ezáltal növeli a mátrix stabilitását, az EOP pathogenesisében nem volt ismert (4). A PAI-1 a szerin proteáz inhibitorok (szerpin) családjába tartozik, és a legfontosabb fiziológiás inhibitora az urokináz-típusú plazminogén aktivátornak (uPA) és a szöveti típusú plazminogén aktivátornak (tPA). Ezen két aktivátor gátlásának eredménye a plazminogén plazmin átalakulás és a plazmin függő mátrix metalloproteináz (MMP) aktiváció gátlása. A PAI-1 a legjobban tanulmányozott tagja a szerpin szupercsaládnak, melyek átlagosan 350-400 aminosav hosszúságú fehérjék (60). A PAI-1 génje a 7q21.3-q22 kromoszómán található, a fehérje 48-50 kDa méretű. Számos sejt szintetizálja: endothel sejtek, adipocyták, macrophágok, szívizomsejtek és a fibroblastok (61). A PAI-1 expresszió sejtdenzitásfüggést mutat számos

humán sejttípusban, így preadipocytákban (62), bőr fibroblastokban (63) és NIH/3T3 sejtekben (64). A PAI-1 szintézise csökken a konfluens sejtszám irányába haladva. A PAI-1 fehérje a G0 → G1 átmenet során képződik a legnagyobb mennyiségben (65). A PAI-1 képes látens állapotból aktiválódni (66). Míg az uPA/tPA átalakítja a plazminogént aktív szerin-proteáz plazminná, a látens TGF- β -t aktív formájúvá és az elő-MMP-ket MMP-vé, addig a PAI-1 blokkolja uPA/tPA aktivációt, a plazmin képződését, és a plazmin függő MMP aktivációt, ezzel védi az ECM fehérjeit a proteolitikus degradációtól és segíti a mátrix stabilitását illetve a sebgyógyulást (60) (5. ábra). Az emelkedett PAI-1 expresszió eredménye az ECM felhalmozódása (67). Az EOP-ban szenvedő betegek orbita szöveteinek elemzése során kimutatták számos gén fokozott átírását, így a gyulladást/fibrosist fokozó cisztein-gazdag angiogén induktor 61-ét (cysteine-rich angiogenic inducer 61 - CRY61), a kötőszövet növekedési faktorét (CTGF – connective tissue growth factor) és a PAI-1-ét. Mindez azt mutatja, hogy a betegség kialakulásában, illetve progressziójában ezen faktoroknak szerepe van (31). Az OF-ok olyan proteázokat termelnek, amelyek képesek bontani az ECM-et (68). Smith és munkatársainak eredményei azt mutatják, hogy a PAI-1 az egyik legnagyobb mennyiségben expresszált fehérje az IFN- γ -stimulált EOP orbita fibroblastokban (69), ezzel szemben a bőr fibroblastok esetében csak kisebb emelkedést detektáltak. Az mRNA expressziókat vizsgálva 28-szoros emelkedést találtak a súlyos aktív EOP-ban szenvedő betegek dekompressziós műtét során eltávolított orbita kötőszövetében (70). Ismert, hogy az OF-ok PAI-1-et szintetizálnak, és az expressziót fokozza a TGF- β , IFN- γ és a leukoregulin (69, 71, 72). Emellett kimutatták, hogy a különböző méretű HA fragmentek indukálják a PAI-1-t és gátolják az uPA transzkripcióját és expresszióját egér macrophágokban, ami arra utal, hogy a HA fragmentek potenciális szabályozói a gyulladásos fibrinolitikus rendszernek (58). A plazminogén aktivátor rendszer és a PAI-1 szerepe, illetve kapcsolata a HA-nal az EOP pathomechanizmusában még nem tisztázott.



5. ábra. A plazminogén aktivátor inhibitor-1 szerepe az extracelluláris mátrix stabilizálásában. Az ECM degradációja és épülése közötti egyensúly fenntartásában a plazminogén aktivátor rendszer fontos szerepet tölt be. A plazminogén aktivátorok hatására alakul a plazminogén plazminná. A plazmin proteáz, mely az ECM számos proteinjét képes hasítani. A rendszer több ponton szabályozható, ezek közül a plazminogén aktivátor inhibitor 1-es típusa (PAI-1) a folyamat jelentős gátló faktora. Működése során csökken az ECM komponenseinek degradációja, és ezáltal nő a mátrix stabilitása. (MMP: mátrix metalloproteinázok, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor 1, TIMP: szöveti metalloproteináz inhibitor, ECM: extracelluláris mátrix). Longo and Higgins (2019) (31) nyomán módosítva.

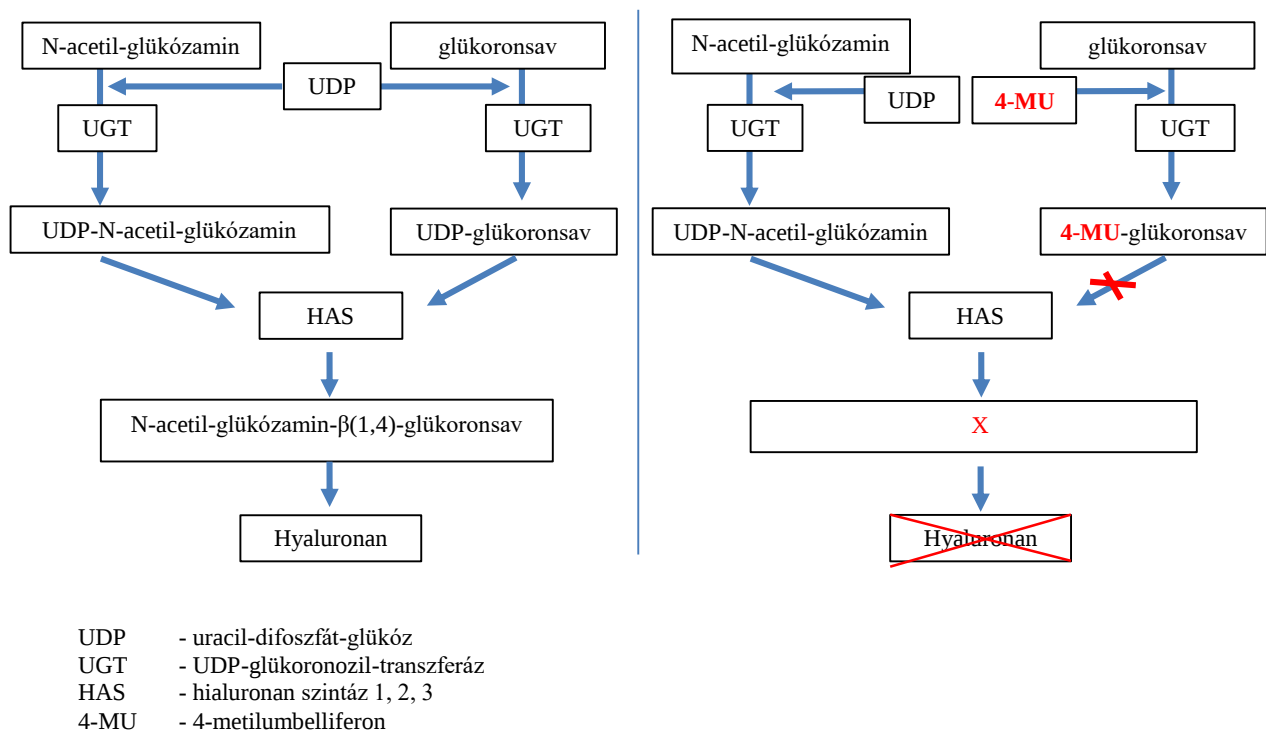
3.3.4. A transzformáló növekedési faktor béta

A TGF- β fontos szerepet tölt be a sejtnövekedésben és a differenciálódásban, emellett szerepe van a szöveti regenerálódásban és az ECM termelés útján a fibrózis szabályozásában. Más autoimmun kórképekben is kimutatták a szerepét, például a szisztémás lupus erythematosusban (SLE) és a glomerulosclerosisban (73). Három izoformáját azonosították (β 1, β 2 és β 3). Számos biológiai folyamatban részt vesz, például a sejtek proliferációjában, illetve az ECM felhalmozódásban. Fokozza a proteoglikánok szintézisét és felhalmozódását (74). A TGF- β stimulálja a bőr fibroblastok, humán ito sejtek (LI90 sejtvonal), máj parenchima sejtek és a humán malignus mesothelioma sejtek HA szintézisét (73). A HAS-ok esetében is kimutatták a

TGF- β hatását, azonban sejttípusonként eltérő hatást tapasztaltak: szinoviális fibroblastok esetében fokozta a *HAS1* expressziót, viszont gátolta a *HAS3* expressziót (53, 57). EOP-os betegek orbita szöveteiben fokozott TGF- β expressziót írtak le közép- és súlyos EOP esetén, amelynek a mennyisége pozitív korrelációt mutatott a CAS-sal (35). Emellett emelkedett PAI-1 expressziót találtak, amelyet számos cytokin és növekedési faktor szabályoz, többek között maga a TGF- β (60).

3.3.5. A 4-metilumbelliferon

A 4-metilumbelliferon (4-MU) kedvezően befolyásolja állatmodelleken autoimmun, krónikus gyulladásos és daganatos megbetegedések lefolyását (6, 75, 76). A HA termelést bizonyítottan gátolja *in vitro*. Kétféleképpen csökkentheti a HA termelést: egyrészt annak egyik komponenséhez, a glükoronsavhoz kötődve kompetitív gátlást fejt ki, másrészt a HAS-ok mRNS expresszióját csökkenti (6). A HA szintézis (6. ábra) során a 4-MU az UDP-glükoronozil transzferáz (UGT) enzim kompetitív szubsztrátja. A HAS-ok az UDP-hez kötött GlcA és GlcNac prekursorokból építik fel a HA polimert, azonban, ha a 4-MU jelen van a rendszerben, akkor a glükoronsav inkább a 4-MU-hoz kötődik az UDP helyett, így a HAS enzimek nem tudják szintetizálni a polimert. A 4-MU számos európai országban nem vényköteles gyógyszerként forgalomban van epehajtóként (6).



6. ábra. A 4-metilumbelliferon HA szintézist gátló hatásának sematikus ábrája (6).

3.4. Az endocrin orbitopathia diagnosztikája

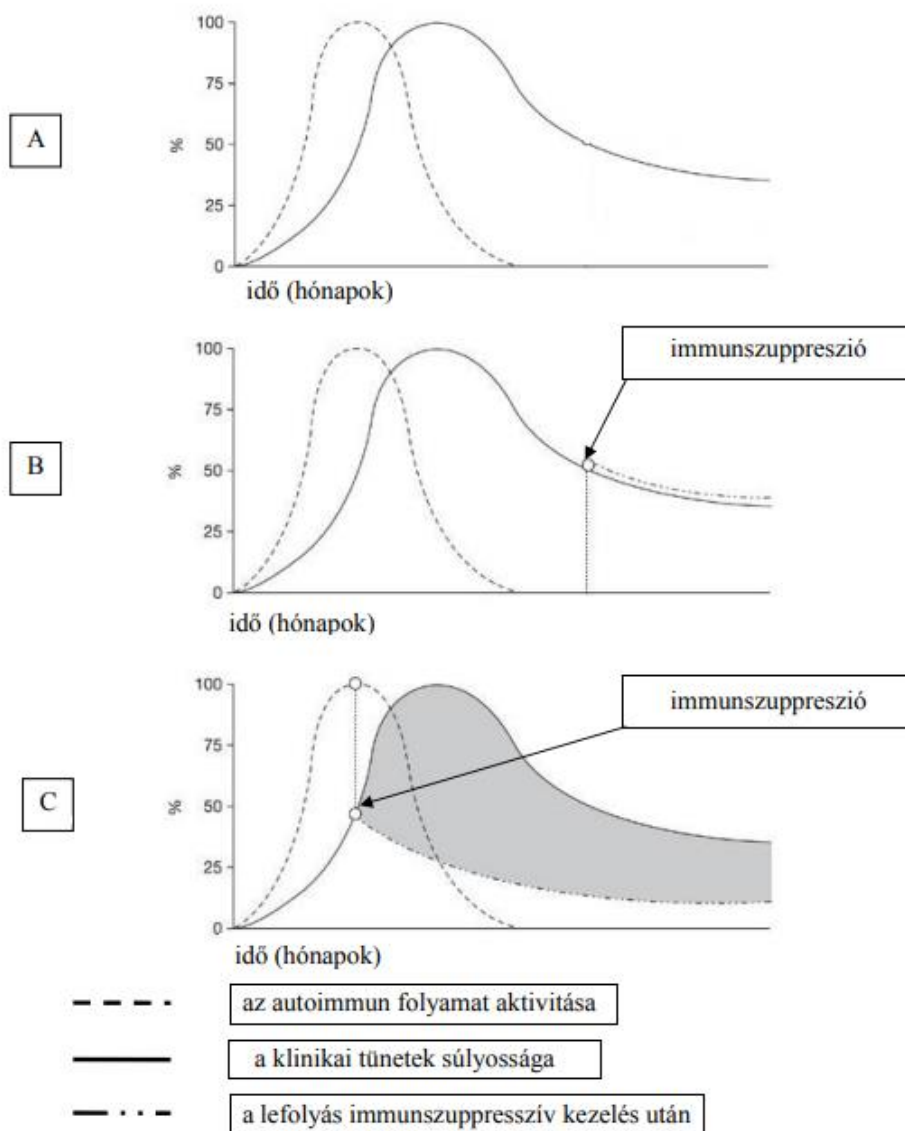
Az EOP diagnózisa egyértelmű, amikor a hyperthyreosis és a diffúz golyva együtt jelentkezik az orbitopathiával (77). Azonban azokban a betegekben, ahol nincs nyilvánvaló hyperthyreosis, antitest meghatározásra és képalkotó vizsgálatokra van szükség az EOP bizonyítására vagy kizárására. Az emelkedett szabad T_4 és csökkent TSH szint diffúz strúma esetén elegendő a GD diagnózis felállításához. Az emelkedett szabad T_3 és totál T_3 szintje a szérumban szintén gyakori a hyperthyreosisban szenvedőknél. A másik fontos paraméter a TSH-receptor elleni antitest (TRAb) pozitivitás (78).

A jelenleg használatos képalkotó eljárások az EOP diagnózisa során az orbita ultrahang (UH), a komputertomográfia (CT) és a mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI). Alkalmazható az egyfoton-kibocsátásos, számítógépes metszeti képalkotás (SPECT) (79)

^{99m}Tc -diethylenetriamine-pentaecetsavval (^{99m}Tc -DTPA-SPECT), melyet a debreceni munkacsoport írt le és alkalmazott először világviszonylatban (80).

3.5. Az endocrin orbitopathia immunológiai aktivitása

Az EOP klinikai tüneteinek és aktivitásának időbeli lefolyását a Rundle görbe mutatja be (7. ábra), melyet 1960-ban írtak le (81). Az EOP pathomechanizmusának kezdetén klinikai tünetek nélkül zajlik az orbita autoimmun folyamat aktív része. A tünetek súlyossága a kialakulástól számított 6-24 hónapban tetőzik, ekkor az immunológiai folyamatok már nagyrészt befejeződtek, és néhány hónapon belül a betegség fibrotikus szakasza következik (7. ábra, A). A betegség lefolyása során fontos a különböző szakaszokat elkülöníteni, mivel az inaktív szakban alkalmazott immunszuppresszív terápia már hatástalan (7. ábra, B), viszont az immunológiai aktivitás csúcsán a kezelés hatásos (7. ábra, C) (81).



7. ábra. Az endocrin orbitopathia lefolyása. **A:** Az EOP természetes lefolyása, **B:** Inaktív stádiumban adott immunszuppresszív kezelés hatástalan, **C:** Aktív stádiumban, korán adott immunszuppresszív kezelés kedvezően hat a klinikai tünetekre (81).

3.6. Az endocrin orbitopathia kezelése

Az EOP kezelésére 2008-ban közösen fogalmazott meg ajánlást az European Thyroid Association (ETA) és az EUGOGO (82), majd ezt módosították 2016-ban. A jelenlegi

ajánlások tartalmazzák, hogy az EOP-os betegeket olyan centrumokba kell irányítani, ahol az endokrinológus, a szemész és a sugárterápiás szakember együttesen kezeli a beteget, illetve fel kell hívni a figyelmüket a dohányzás elhagyásának fontosságára (83).

Enyhe EOP esetén a beteg követése mellett a szelén pozitív hatását bizonyították. A szelénnek szerepe van az immunrendszer normál működésében. Marcocci és munkatársai 2011-es eredményei azt mutatják, hogy 200 µg szelén naponta pozitív hatású enyhe EOP-ban; hat hónapi szelén alkalmazás után további 6 hónap követési idő alatt a kezelt betegeknél javult az életminőség, a CAS a szelénnel kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb csökkenést mutatott (84). Középsúlyos és súlyos EOP esetén immunszuppresszív terápia alkalmazása szükséges, ez 4,5 g metilprednisolon adását jelenti intravénásan (hetente egyszer 500 mg hat héten át, majd ugyanennyi ideig hetente egyszer 250 mg), majd orálisan a dózist fokozatosan lehet leépíteni. Súlyos EOP-ban a látóideg kompressziója esetén nagydózisú intravénás kortikoszteroid adása szükséges; ha 2 héten belül nem történik javulás, sürgős sebészeti beavatkozást tesz szükségessé az orbita csontos falának elvételével (83).

A pentoxifillin adásának magyar vonatkozása van. Balázs Csaba és munkatársai 1997-ben megjelent közleményükben számoltak be a pentoxifillin pozitív hatásáról EOP-ban. 10 beteget (8 nő és 2 férfi) vizsgáltak, közülük 2 kettő nem reagált a kezelésre, viszont a többi esetben jelentősen csökkent a total eye score (TES), a plazmában a glükózaminoglikánok szintje és a TNF- α szintje a szérumban (85). Túrke Boglárka és Balázs Csaba további eredményeikről az Orvosi Hetilapban megjelent cikkben számoltak be, miszerint a szer hatékony volt pretibialis myxoedema esetében is (86).

A hyperthyreosis radioaktív jód izotóp kezelése során a béta részecskék follikuláris sejt apoptózist indukálnak, ezáltal csökkentve a felszabaduló pajzsmirigy hormon szinteket (87). A radiojód kezelést preferálják az olyan betegek esetében, akik thyreostaticus gyógyszerekkel történő kezelés után is magas TRAb szinttel rendelkeznek, magas vagy elhúzódó thyreostaticus

gyógyszerdózist igényelnek, nem képesek elérni az euthyreoid állapotot a gyógyszeres kezeléssel. Kontraindikált a radiojód alkalmazása aktív közép súlyos és súlyos EOP esetében, különösen ha az emelkedett TRAb titerrel jár (87). A radiojód kezelés már meglévő EOP-nál a tünetek rosszabbodását okozhatja, illetve a rizikócsoportokban (dohányzók, magas TRAb szint) recidívát vagy friss EOP kialakulását idézheti elő. Ezek a betegek, ha az EOP inaktív, radioaktív jódizotóp kezelést követően megelőzőképpen orális kortikoszteroidokkal kezelendők, mely a kedvezőtlen orbita hatást kivédi (83).

Az orbita irradiáció hatásos az EOP kezelésében, illetve kiegészíti a glükokortikoid kezelést (87). Szokásos dózis 10 alkalommal 2 Gy adása mindkét orbitára (88). Az intravénás kortikoszteroid kezelés kiegészítése a retrobulbáris irradiációval bizonyítottan hatékonyabb, mint külön-külön alkalmazva (84).

A thyreostaticus kezelések során propylthiouracilt (PTU), methimazolt (MMI), illetve carbimazolt alkalmazhatunk. Közös hatásmechanizmusuk a pajzsmirigy peroxidáz (TPO) enzim és vele együtt a pajzsmirigy hormon szintézis több lépésének gátlása. Emellett a PTU képes blokkolni a $T4 \rightarrow T3$ átalakulást. A gyógyszeres kezelés alkalmazását preferálják abban az esetben, ha nagy a végleges gyógyulás esélye (nincs vagy enyhe-közép súlyos EOP, kis méretű golyva, női nem, alacsony vagy negatív TRAb érték (11) terhesség alatt (PTU az első trimeszterben preferált), és amikor a radiojód terápiának vagy a pajzsmirigy eltávolításnak nagyobb a kockázata, mint a haszna (87).

A pajzsmirigyműtét EOP esetén teljes pajzsmirigy-eltávolítás. Alkalmazhatóságát növeli, hogy golyva és pajzsmirigy daganat együttes jelenlétének esetében is alkalmazható, és nem súlyosbítja az EOP-ot (87). Teljes pajzsmirigy-eltávolítás után 6 hónappal az EOP nagyobb mértékben javult a gyógyszeresen kezelt csoporttal szemben (89). Közép súlyos vagy súlyos EOP és magas TRAb szint esetén a műtét előnyben részesítendő (87).

Az utóbbi évtizedekben számos új lehetséges terápiát dolgoztak ki az EOP kezelésére. Többségük biológiai immunterápia. A rituximab (RTX) humán monoklonális antitest a B-sejtek felszínén található CD20 komplex ellen, amit eredetileg a B-sejtes lymphoma kezelésére fejlesztettek ki, de számos más autoimmun betegség esetében is sikeresen alkalmazták (87, 90). EOP-ban az első eredmények 2006-ban jelentek meg (91, 92), hazánkban először pedig munkacsoportunk alkalmazta sikerrel öt súlyos, hagyományos kezelésre nem reagáló beteg esetében (93). Sikeresen alkalmazták a tocilizumabot (TCZ) és a teprotumumabot (94). TNF- α gátlók alkotják a következő csoportot; közöttük találjuk a etanerceptet, az adalimumabot és az infliximabot (87, 93). A következő ígéretes vegyület a mikofenolát-mofetil (MMF), amelyet már sikerrel használnak egyéb autoimmun betegségek kezelése során szelektív immunszuppresszánsként; szignifikánsan magasabb volt a hatékonysága a kettőslátás és proptosis kezelésében a 24 hetes glükokortikoid kezeléssel szemben (95).

4. Célkitűzések

Az EOP súlyos, látást veszélyeztető betegség, amelynek a kezelése a mai napig nem megoldott. Kísérleteinkkel szeretnénk jobban megismerni a betegség pathomechanizmusát, illetve azt, hogy hogyan és mivel tudjuk befolyásolni annak két fontos pontját, a PAI-1 és HA termelést. A megfigyeléseket EOP-ban szenvedő betegek orbita szövetéből létrehozott primer sejtvonalakon tettük.

1. Olyan sejtes modell létrehozása műtéti szövetmintákból, amelyen tanulmányozható az orbita fibroblastok viselkedése különböző hatásokra.
2. A betegség pathogenesisében szerepet játszó volumen növekedés során a megváltozó fibroblast-denzitás modellezése és hatásának vizsgálata a PAI-1 és a HA termelésre egészséges és EOP orbita eredetű, illetve bőr fibroblast tenyészetek esetében.
3. Az EOP-ban szenvedő betegek orbita szövetében is jelen lévő TGF- β hatásának vizsgálata különböző eredetű fibroblast kultúrák HA és PAI-1 termelésére, valamint proliferációs rátájára.
4. Lehetséges gyógyszeres beavatkozási pont azonosítása a fibroblastok HA termelésének gátlására.

5. Módszerek

5.1. Primer fibroblast sejtvonalak létrehozása

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet Endokrinológia Tanszék szakrendelésein, Szemklinikáján, illetve Sebészeti Klinikáján megjelent betegek szövetmintáit használtuk. A betegek kiválasztása az előre meghatározott kritériumok alapján történt. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta, azokat a Helsink Deklarációnak megfelelően végeztük el, és a résztvevő betegek beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

Öt EOP-ban szenvedő beteg dekompressziós műtete során eltávolított orbita kötőszövetből öt primer orbita fibroblast sejtvonalat hoztunk létre. Minden esetben a betegség inaktív fázisában történt a dekompressziós műtét. Két beteg volt pozitív TRAb antitestre nézve. A dekompressziós műtét előtt két beteg esett át pajzsmirigy eltávolításon, két beteg kapott radiojód kezelést, és egy beteg kivételével mindenki szedett thyreostaticumot korábban a betegség lefolyása során. Minden beteg részesült kortikoszteroid kezelésben, és két beteg esett át orbita irradiáción; a szteroid kezelés befejezése és az irradiáció óta legalább 12 hónap telt el. A műtét előtti utolsó két hónapban csak diuretikumokat, β -blokkolókat és tiroxin pótlást kaptak a betegek. A betegek a műtét idején alacsony normál vagy szupprimált TSH-val és a referencia tartományon belüli, magas-normál pajzsmirigy hormon szintekkel rendelkeztek. A kontroll orbita kötőszöveteket öt beteg nem pajzsmirigy betegséghez kapcsolódó szemműtete (enukleáció) során eltávolított kötőszövetből nyertük. A bőr szöveteket négy hasfali sérv műtét során nyertük. A betegek adatait a 2. táblázatban mutatjuk be.

Betegek	Kor	Nem	Betegség	A GD kialakulásától műtétig eltelt idő (év)	A GD kezelése	Az EOP kialakulásától műtétig eltelt idő (év)	Az EOP kezelése	CAS	Műtét típusa	Szövet eredete
1	37	nő	EOP	11	radioaktív jód, thiamazole	8	Orbita irradiáció, kortikoszteroid	1	Orbita dekompresszió lipektómiával kombinálva	Extraconal posterior orbita zsírszövet
2	42	nő	EOP	4	thyroidectomy, thiamazole	2	kortikoszteroid	1		
3	44	nő	EOP	9	thyroidectomy, propylthiouracil	1	Orbita irradiáció, kortikoszteroid, pentoxiphylline	2		
4	49	férfi	EOP	3	radioaktív jód	3	kortikoszteroid	3		
5	55	férfi	EOP	1	thyroidectomy	1	Orbita irradiáció, acetazolamid	3		
6	46	férfi	intraokuláris rosszindulatú melanóma	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Enukleáció	Intraconal posterior orbita zsírszövet
7	62	férfi								
8	66	férfi								
9	69	férfi								
10	71	férfi	hasi sérv	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Sérvműtét	hasi borszövet
11	20	férfi								
13	52	férfi								
14	63	nő								
15	78	férfi								

2. táblázat. Azon betegek jellemzői, akiknek szövetmintáit a kísérletek során használtuk (n.a. – nem értelmezhető, mert nem pajzsmirigybetegek)

Az orbita fibroblast vonalakat a Bahn és munkatársai által korábban leírt metodika alapján hoztuk létre (96). A sterilen eltávolított, azonnal M199 (Biosera, Nuaille, Franciaország) tápfolyadékba helyezett kötőszövet darabokat 2x2 mm-es darabokra vágtuk, majd négyszer mostuk antibiotikum (penicillin/sztreptomicin) tartalmú PBS-ben (Biosera, Nuaille, Franciaország), hogy eltávolítsuk belőle a vörösvértesteket. Mosást követően a szövetdarabokat 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészébe (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) helyeztük. A sejtek szövetből történő kinövéséhez 20 % FBS, penicillin/sztreptomicin és stabil-glutamin tartalmú M199 tápfolyadékot alkalmaztunk, és 37°C-on, 5 % CO₂ mellett tenyésztettük. A tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük. Kettő-négy hét múlva, a tenyészet proliferációs potenciáljától függően, a szövetdarabokat eltávolítottuk, és a továbbiakban 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) penicillin/sztreptomicin és stabil-glutamin tartalmú tápfolyadékot alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A konfluencia elérése után TrypLE Express-el (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kezelve T75-ös flaskába (JetBiofil, Alicante, Spanyolország) passzáltuk a sejteket a sejtvonalak felszaporítása érdekében. A felszaporítást követően a sejteket újra kezeltük TrypLE Express-el, majd centrifugálást (1000 G) követően fagyasztó folyadékban szuszpendálva folyékony nitrogénben tároltuk a kísérletek elvégzéséig. Primer sejtvonalakkal dolgoztunk, ezért a kísérletek során alacsony passzázs számú (2-8) tenyészeteket használtunk. Vizsgálataink során a sejteket 24 lyukú plate-be (JetBiofil, Alicante, Spanyolország) szélesztettük meghatározott sejtszámmal. Hat különböző denzitást választottunk a további kísérletekhez: $6,24 \times 10^4$, $3,12 \times 10^4$, $1,56 \times 10^4$, $7,8 \times 10^3$, $3,9 \times 10^3$ és $1,95 \times 10^3$ sejt/cm². A sejtek számolását Bürker-kamrában végeztük. A legnagyobb denzitástól kiindulva felező hígítással értük el a kívánt sejtszámokat. Az $1,56 \times 10^4$ sejt/cm² a konfluens, az ennél nagyobb értékek jelentik posztkonfluens, míg a kisebb értékek a prekonfluens denzitást. 24 óra elteltével a sejteket 24 órás szérum megvonással szinkronizáltuk. Ezt követően újabb 24 óráig inkubáltuk

a sejteket a különböző kezeléseket tartalmazó és kontroll tápfolyadékkal. A felülúszókat összegyűjtöttük és -20°C-on tároltuk a mérések kivitelezéséig. Minden kísérletet legalább háromszor végeztünk el, és minden esetben triplikátumban dolgoztunk. A kezelésekhöz használt TGF- β -t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) M199-ben, a 4-MU-t és 4-metilumbelliferil-glükoronidot (4-MUG) dimetil-szulfoxidban (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldottuk és így adtuk a tenyésztő oldatokhoz; a kísérlet kivitelezése alatt a DMSO végkoncentrációja a sejteken 0,2 % volt.

5.2. Sejtproliferációs vizsgálat

A vizsgálatot 96 lyukú plate-ben végeztük. A meghatározott sejtszámot minden esetben Bürker-kamrában történő számolással és megfelelő hígítással értük el. A gyártók által megadott leírás alapján végeztük a mérést. A 5-bromo-2'-deoxyuridin (Cell Proliferation ELISA BrdU Colorimetric Kit, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Svájc) oldatot hozzáadtuk a sejtek felülúszójához és 37°C-on, 5 % CO₂ és mellett 2 órán át inkubáltuk. Ezután a felülúszókat eltávolítottuk és fixáltuk a sejteket a plate alján 30 percig FixDenat oldat hozzáadásával. A fixáló oldat eltávolítása után peroxidázhoz kapcsolt anti-BrdU antitestet adtunk a sejtekhez, 90 percig, szobahőmérsékleten. Az utolsó lépés a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine szubsztrát volt 10 percig. A reakció leállítása 2 N H₂SO₄ oldattal történt, az abszorbanciát 450 nm-en mértük (referencia tartomány: 620 nm) Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Minden esetben a kezeletlen tenyészetek mért értékeihez hasonlítottuk a kezelt tenyészetek abszorbancia értékeit 10⁵ sejtre történő normalizálást követően.

5.3. Metabolikus aktivitás vizsgálat

A Biomedica által forgalmazott EZ4U kit (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Bécs, Ausztria) felhasználásával vizsgáltuk a sejtek metabolikus aktivitását a különböző kezeléseket követően, a gyártó által megadott leírás alapján. A 96 lyukú plate-be szélesztett sejteken levő 100 µl tápfolyadékhoz 10 µl festékoldatot adtunk. A sejtek metabolikus aktivitásuktól függően különböző mértékben képesek a sárga tetrazóliumot piros színű formazán származékká alakítani. A festék hozzáadását követően 4 órát inkubáltuk 37°C-on. Az abszorbanciát 450 nm mértük (referencia tartomány: 620 nm) Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Minden esetben a kezeletlen tenyészetek mért értékeihez hasonlítottuk a kezelt tenyészetek abszorbancia értékeit.

5.4. Citotoxicitás vizsgálat

A citotoxicitás vizsgálat során Vybrant Cytotoxicity Assay Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk a gyártó leírásának megfelelően. A kit detektálja a sérült vagy halott sejtek arányát 4-MU kezelést követően, azáltal, hogy a kiszabadult glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD) által katalizált enzimreakciót méri a felülúszóban. A diaforáz enzim átalakítja a resazurint piros fluoreszkáló resorufinná. A sejteket 96 lyukú plate-ben tenyésztettük 100 µl tápfolyadékban. Készítettünk egy sejtmentes és teljesen lizált belső kontrollt is. A 24 órás kezelést követően 50 µl, resazurint, glükóz-6-foszfátot, NADP⁺-t és diaforázt tartalmazó reakció elegyet adtunk a tenyészetekhez. A teljes lízishez 1 µl lízis puffert adtunk a tenyészetekhez, majd 10-30 percig 37°C-on inkubáltuk. Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) mértük a fluoreszcenciát (excitáció 535 nm, emisszió 625 nm). Sejtmentes tápfolyadék, illetve a teljesen lizált sejtek

fluoreszcenciáját figyelembe véve számítottuk ki a kezelt tenyészeteken mért értékekből a citotoxicitás mértékét.

5.5. Kaszpáz aktivitás mérés

A kaszpáz aktivitás meghatározásához a kereskedelmi fogalomban kapható Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kitet használtuk a gyártó által kiadott útmutatónak megfelelően. Ez a kit alkalmas az apoptózis mértékének meghatározására. A mérés során a lumineszcencia mértéke arányos a kaszpáz aktivitással. A kísérlet kivitelezése során a megfelelő kezelést követően a sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, majd 95 µl PBS-t és 95 µl Caspase-Glo 3/7 reagenst adtunk hozzájuk. A megfelelő keveredés érdekében 500 RPM-en rázattuk a plate-eket, és szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. Ezt követően fehér színű, lumineszcens méréshez alkalmas 96 lyukú plate-be átmértük és Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) mértük a lumineszcenciát 1000 ms után.

5.6. PAI-1 fehérje és HA mennyiségének meghatározása a felülúszóban

A felülúszóba került PAI-1 fehérje és HA szintek meghatározásához a kereskedelmi fogalomban kapható DuoSet Human Serpin E1/PAI-1 illetve DuoSet Hialuronan (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) kiteket használtuk a gyártó által kiadott útmutatónak megfelelően. A pericelluláris HA meghatározáshoz a sejteket kétszer mostuk PBS-el majd 0.05 % (w/v) trypsin–EDTA oldattal kezeltük és 37°C-on 20 percig inkubáltuk, majd FBS hozzáadásával (10 v/v % végkoncentráció) az enzimreakciót leállítottuk. A sejtszuspenziót 2200 G-n centrifugáltuk 5 percig. A pericelluláris HA méréshez a felülúszót használtuk.

Minden mérésnél az FBS HA tartalmát figyelembe vettük, és minden esetben a HA termelést 10^5 sejtre normalizáltuk, hogy a különböző denzitásokon mért eredmények összehasonlíthatóak legyenek. Az abszorbanciát 450 nm mértük (referencia tartomány: 620 nm) Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Minden esetben a kezeletlen tenyészetek mért értékeihez hasonlítottuk a kezelt tenyészetek abszorbancia értékeit.

5.7. Polimeráz láncreakció (PCR)

A 24 lyukú plate-ben lévő sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, majd PBS-sel kétszer mostuk. A plate aljában lévő sejteket a TRI reagensben (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) lizáltuk, majd az RNS izolálásig a mintákat -20°C -on tároltuk. A kiolvasztott mintákat homogenizáltuk, és 100 μl kloroformot adtunk hozzá. A kloroformmal extraháltuk a szuszpenzióban lévő összes RNS-t. 16 000 G-n centrifugáltuk 15 percig. A felső vizes fázist új DNáz és RNáz mentes Eppendorf csőbe pipettáztuk az átmeneti fázis érintése nélkül. 375 μl szobahőmérsékletű 100 %-os izo-propanolt adtunk hozzá, a vizes fázisban található RNS precipitációjához, majd 16 000 G-n centrifugáltuk 10 percig. A következő lépésben a felülúszó eltávolítása után a pellet mosása következett 1 ml hideg 75 %-os etanollal. Befejező lépésként centrifugálás következett 12 000 G-n 10 percig. A teljes felülúszó eltávolítása után az izolált RNS-t nukleáz-mentes vízben oldottuk, és koncentrációját NanoDrop (NanoDrop™ 2000/c Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük, majd -20°C -on tároltuk az reverz transzkripció kivitelezéséig. A tisztított RNS mintákat High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham) felhasználásával cDNS-sé írtuk át a gyártó leírásának megfelelően.

A TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham) használatával detektáltuk a *PAI-1*, *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*, *HYAL1* és *HYAL2* expressziókat, a

glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (*GAPDH*) háztartási gén expressziójához viszonyítva. Az RT-PCR reakciót a BioRad (Hercules, CA, USA) CFX96 rendszerén végeztük. Az eredményeket a *GAPDH* mRNS expressziós szintjéhez normalizáltuk a Δ CT metodikát alkalmazva 40 ciklust követően.

5.8. Statisztikai feldolgozás

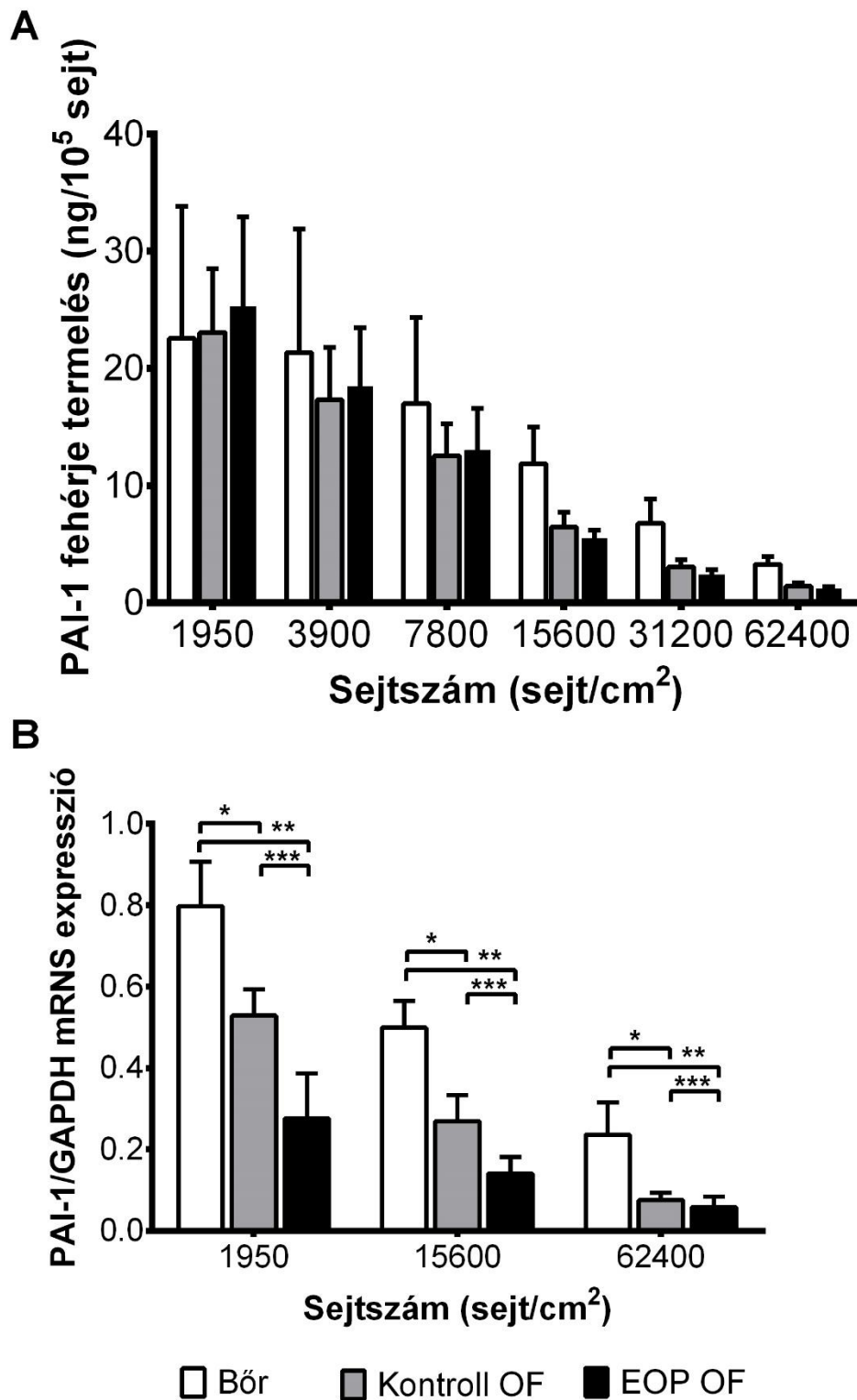
A statisztikai elemzéseket a STATISTICA 7 software használatával végeztük (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Az adatokat minden esetben az átlag $\pm$ SD értékkel ábrázoltuk. Ismételt méréseket varianciaanalízis (ANOVA) során a kezelés (1 ng/ml TGF- β és 1 mmol/l 4-MU) mint belső faktor és a fibroblastok származási helye (bőr, kontroll és EOP) mint csoportok közötti faktor szerepelt, és Fisher LSD *post hoc* analízist alkalmaztuk a különbségek megbecsülésére. A szignifikancia szintet a $p < 0,05$ értéken fogadtuk el.

6. Eredmények

6.1. A sejtdenzitás hatásának vizsgálata a PAI-1 és HA termelésre

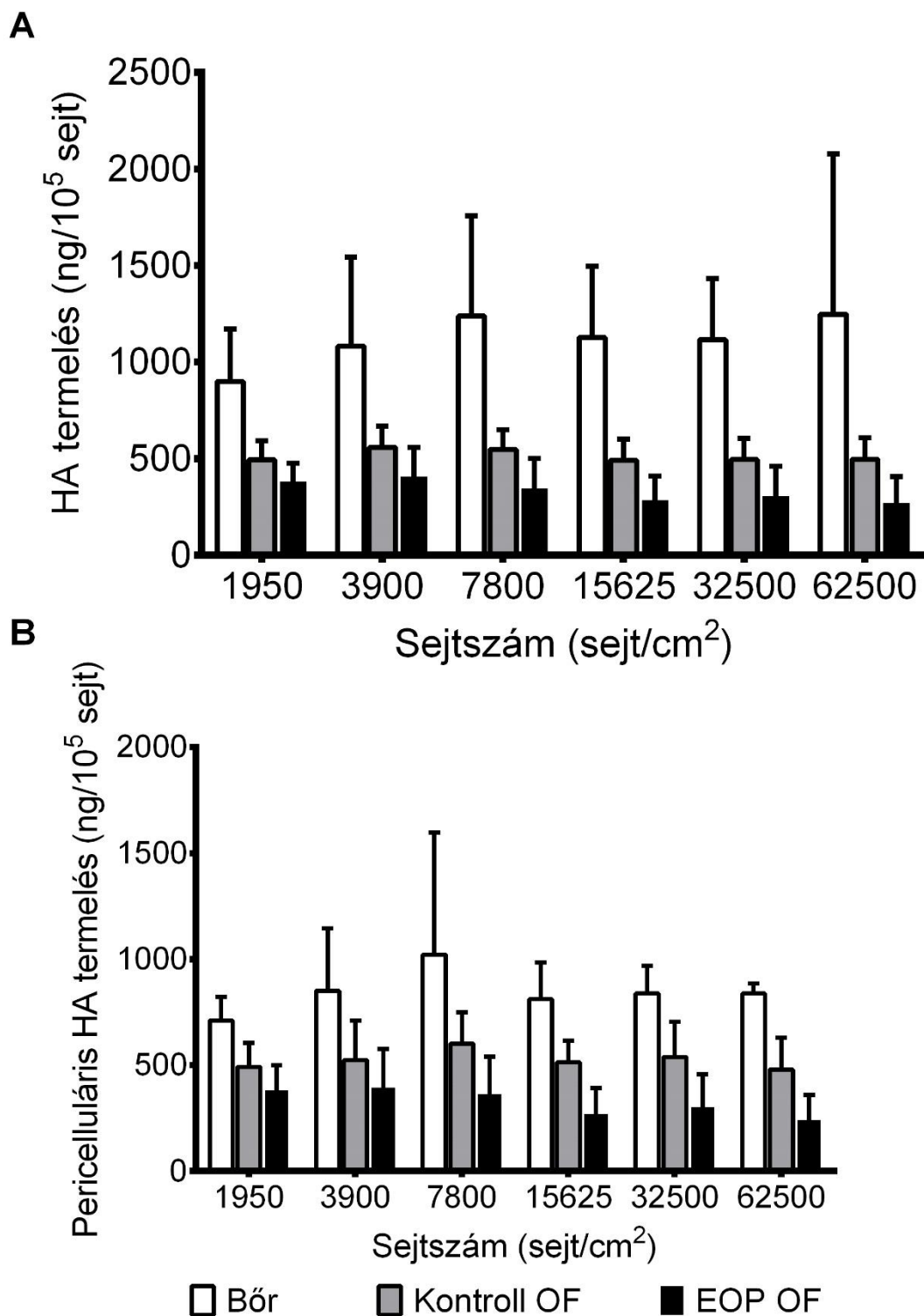
A bőr fibroblastok, kontroll orbita fibroblastok és EOP orbita fibroblastok minden sejtdenzitáson vizsgálva különböző mennyiségű PAI-1 fehérjét termeltek. Korábbi eredményeink alapján a sejttenyészeteket szérumban éheztetéssel szinkronizáltuk a kezelést megelőző 24 órában, ami szignifikánsan nagyobb mennyiségű egységnyi sejtre jutó PAI-1 fehérje termelést eredményezett. Az egységnyi sejtre eső PAI-1 fehérje ($\text{ng}/10^5$ sejt) mennyisége csökkent a növekvő sejtdenzitással (8. ábra, A); a sejtek származási helye nem volt meghatározó faktor, a kontroll OF, EOP OF és bőr fibroblastok hasonlóan viselkedtek ebből a szempontból. A termelt PAI-1 mennyisége a konfluencia eléréséig és az annál nagyobb denzitás értékeken is folyamatosan csökkent. Megállapítottuk, hogy a származási helytől függetlenül a növekvő sejtdenzitás a PAI-1 termelés negatív regulátora a vizsgált sejtvonalak esetében.

Az RT-PCR vizsgálatok eredményei megerősítették, hogy a *PAI-1* mRNS expresszió szintje párhuzamosan csökkent a PAI-1 fehérje koncentrációjával a növekedő sejtdenzitások felé haladva (8. ábra, B). A *PAI-1* mRNS expressziója különbözött az eltérő származási helyű sejtvonalak esetében ($p < 0,01$): csökkenő sorrendben bőr fibroblastok > kontroll OF > EOP OF.



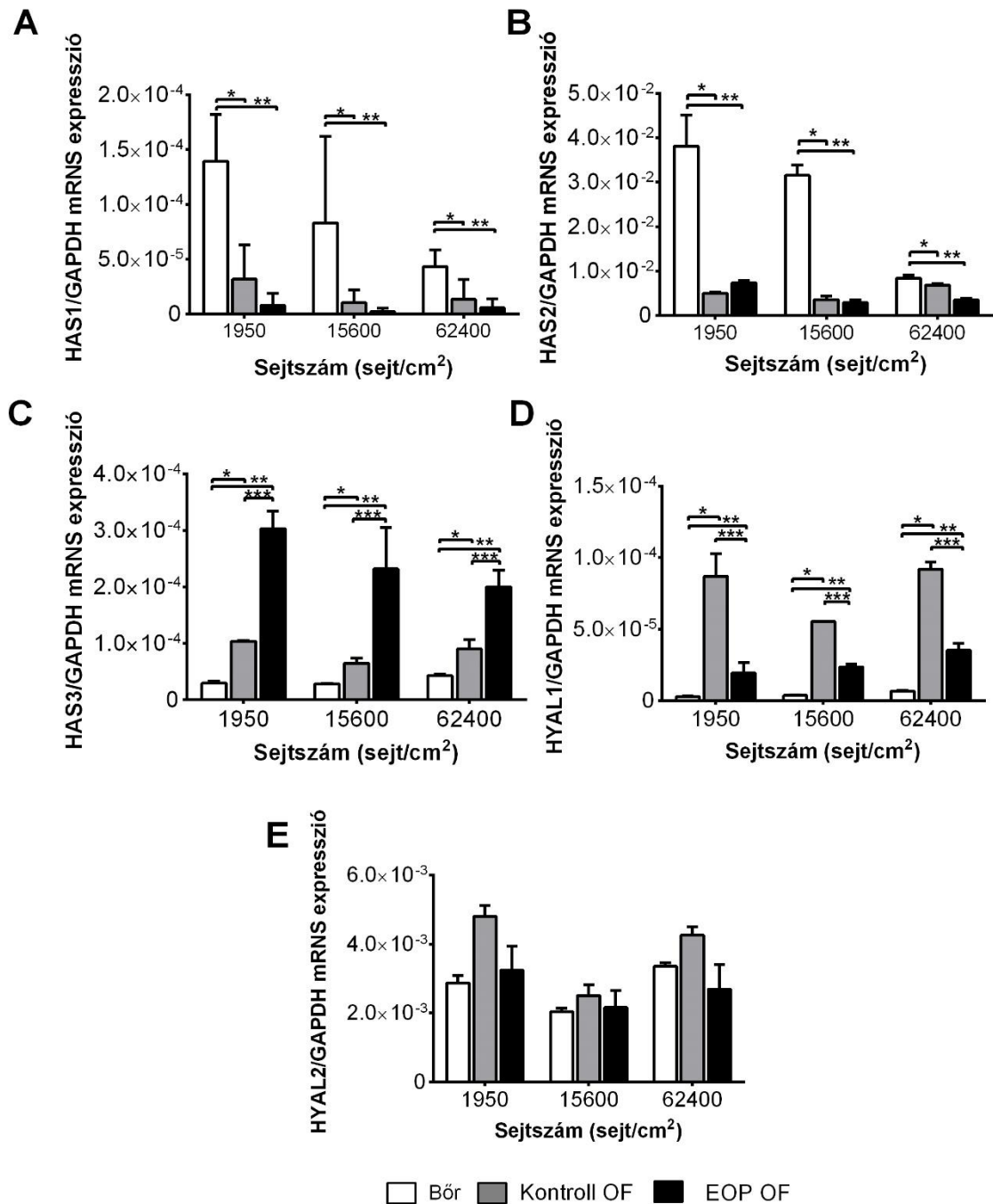
8. ábra. A sejtdenzitás hatása a PAI-1 termelésre. A: A fibroblastok egységnyi sejtre eső PAI-1 termelése a sejtdenzitás növekedésével folyamatosan csökken ($p < 0,000001$). **B:** Az RT-PCR eredményei igazolták, hogy a PAI-1 mRNA szintek párhuzamosan változnak a PAI-1 fehérje szintekkel ($p < 0,0001$), bőr vs. kontroll * $p < 0,01$; bőr vs. EOP ** $p < 0,001$, kontroll vs. EOP *** $p < 0,03$.

A felülúszóban (9. ábra, A) és a pericelluláris térben (9. ábra, B) található HA mennyisége nem mutatott sejtdenzitás függő viselkedést ($p = 0,6$ és $p = 0,2$), viszont a fibroblastok származási helye meghatározta annak mértékét ($p < 0,001$). A *post hoc* analízis megmutatta, hogy a kezeletlen bőr fibroblastok szignifikánsan nagyobb mennyiségű HA-t termelnek, mint a kezeletlen OF (bőr vs. kontroll $p < 0,01$; bőr vs. EOP $p < 0,001$). Az OF esetében nagyobb mennyiségű HA-t ($> 500 \text{ ng}/10^5$ sejt) termelő vonalak csak a kontroll OF közül kerültek ki (2 az 5 vonalból), ezzel szemben alacsonyabb mennyiségű HA termelőket ($< 300 \text{ ng}/10^5$ sejt) csak a EOP OF vonalak között találtunk (3 az 5 vonalból). Hasonló eredményeket kaptunk a pericelluláris HA szintek vizsgálata során (bőr vs. kontroll $p = 0,013$, bőr vs. EOP $p < 0,001$), habár az EOP OF-ok alacsonyabb HA termelést mutatnak, mint a kontroll OF, de ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,06$). Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a felülúszóba kerülő és a pericelluláris térben található HA mennyiség között (bőr $r = 0,72$, $p < 0,01$, kontroll $r = 0,77$, $p < 0,00001$, EOP $r = 0,97$, $p < 0,000001$).



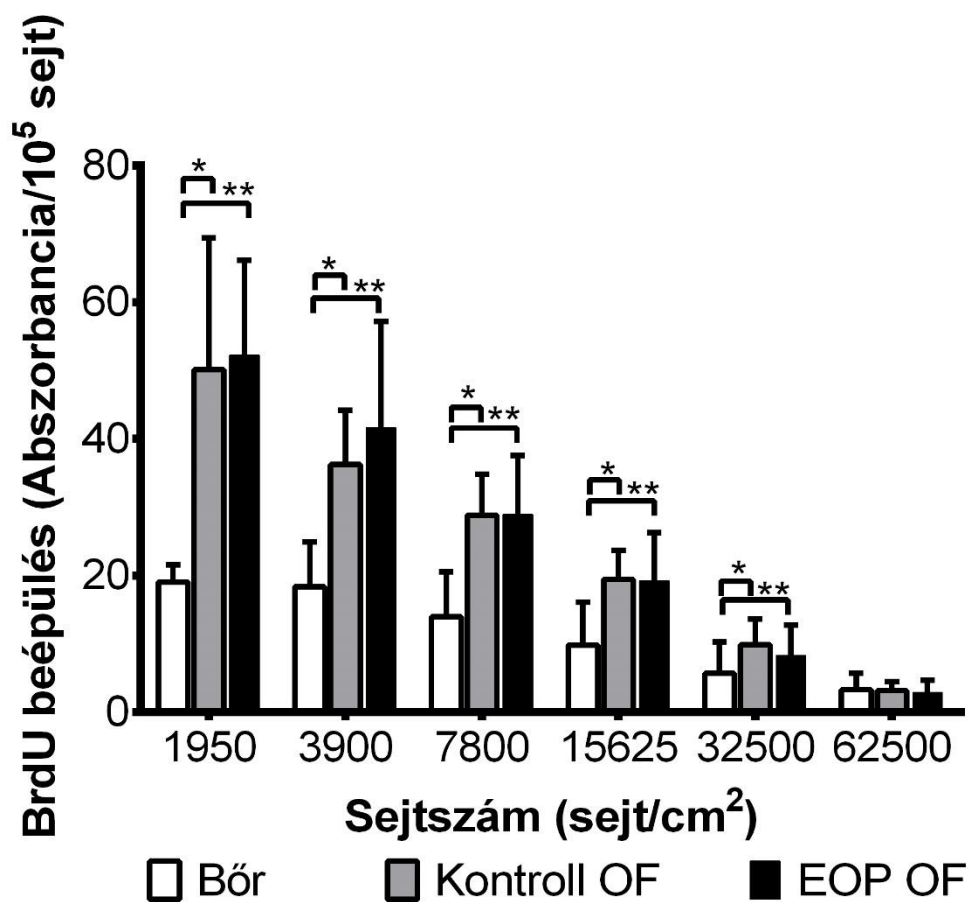
9. ábra. A sejtdenzitás hatása a HA termelésre. A: A fibroblastok által a felülúszóba termelt, egységnyi sejtre eső hialuronan termelés nem mutat denzitásfüggést. A statisztikai analízis eredménye alapján minden vizsgált fibroblast típus egymástól szignifikánsan eltér. **B:** A pericelluláris térben található HA mennyisége sem mutat sejtdenzitás függő változást.

A RT-PCR eredményei azt mutatták, hogy a *hialuronan szintáz 1 (HAS1)* (10. ábra, A) és *hialuronan szintáz 3 (HAS3)* expressziók (10. ábra, C) azonos nagyságrendűek, míg a *hialuronan szintáz 2 (HAS2)* (10. ábra, B) a legnagyobb mennyiségben expresszált enzim minden vizsgált sejtvonal esetében. A HAS enzimek expressziós mintázata sejttípusonként eltérő. A kezeletlen bőr fibroblastok magasabb *HAS1* és *HAS2* mRNA expressziót mutattak, mint a kontroll OF, míg a kezeletlen OF-ok magasabb *HAS3* expressziót mutattak, mint a bőr fibroblastok. A EOP OF-ok magasabb *HAS3* expressziót mutatnak, mint a kontroll OF-ok. A bőr fibroblastok *HAS1* és *HAS2* expressziója a növekvő sejtdenzitással csökken. A hialuronidáz 1 (*HYAL1*) mRNA expressziója (10. ábra, D) sokkal változatosabb képet mutat, mint a hialuronidáz 2 (*HYAL2*) expressziója (10. ábra, E). A kezeletlen bőr fibroblastok rendelkeznek a legalacsonyabb alap *HYAL1* expressziós szintekkel, és a EOP OF *HYAL1* expressziója alacsonyabb, mint a kontroll OF esetében. Alacsonyabb, de nem szignifikáns tendenciát látunk a konfluens tenyészetek *HYAL1* és *HYAL2* termelésében a poszt- vagy prekonfluens tenyészetekéhez viszonyítva.



10. ábra. A sejtdenzitás hatása a hialuronan szintázok expresszióira. A: A *HAS1* expresszió sejtdenzitás függő módon csökken mindhárom sejtvonal típus esetében (bőr vs. kontroll * $p = 0,05$, bőr vs. EOP ** $p = 0,02$). **B:** A *HAS2* expressziója a legmagasabb a vizsgált vonalak esetében (bőr vs. kontroll * $p < 0,0001$, bőr vs. EOP ** $p < 0,0001$). **C:** A *HAS3* expressziója magasabb az OF-ban mint a bőr fibroblastokban (bőr vs. kontroll * $p = 0,03$, bőr vs. EOP ** $p < 0,0001$, EOP vs. kontroll*** $p < 0,001$). **D:** A *HYAL1* expresszió változatos képet mutat (bőr vs. kontroll * $p < 0,001$, bőr vs. EOP ** $p < 0,01$, kontroll vs. EOP *** $p < 0,001$). **E:** A *HYAL2* expressziója nem mutat sejtdenzitásfüggést.

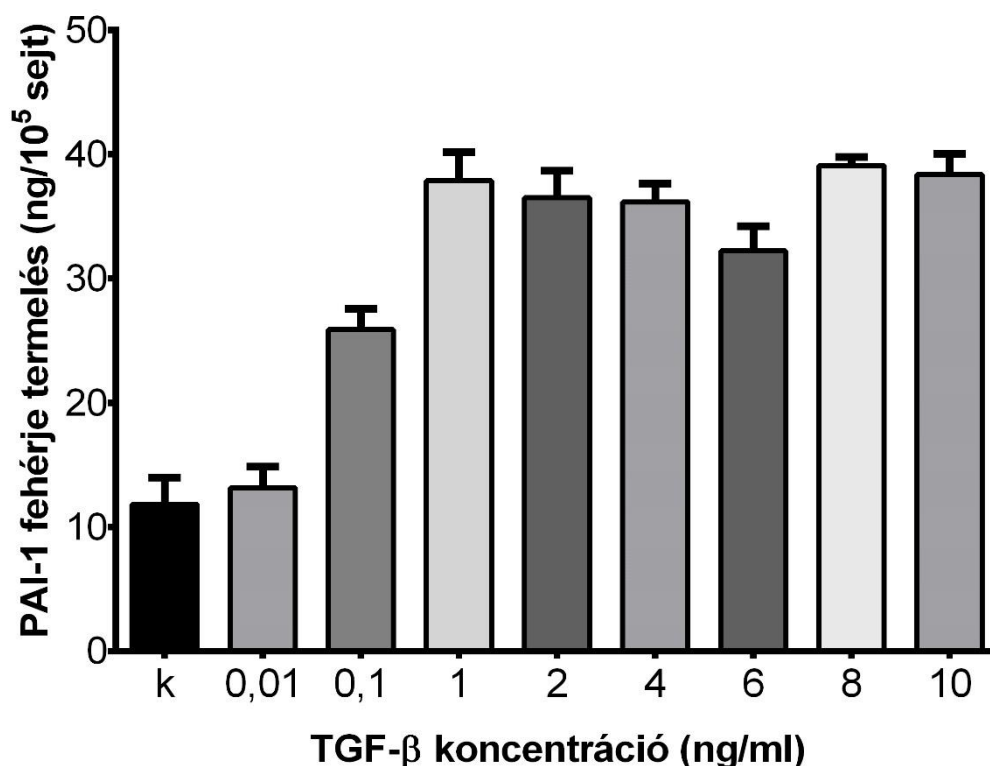
A fibroblastok proliferációs rátája (11. ábra) csökken a növekvő sejtdenzitással minden vizsgált sejtvonalon, a sejtek származási helyétől függetlenül. Pozitív korrelációt találtunk a proliferáció és a PAI-1 szekréció között minden vizsgált fibroblast vonal esetében (bőr $r = 0,81$ $p < 0,01$, kontroll OF $r = 0,71$, $p < 0,0001$, EOP OF $r = 0,70$, $p < 0,0001$). Az osztódó sejtek aránya magasabb volt, egy kivétellel, minden denzitáson az OF esetében, mint a bőr fibroblastoknál (kontroll OF vs. bőr $p = 0,03$, EOP OF vs. bőr $p = 0,02$). A *post hoc* analízis alapján nem találtunk különbséget a kontroll és az EOP OF a proliferációs rátájában.



11. ábra. A sejtdenzitás hatása a proliferációra. A fibroblastok egységnyi sejtre vonatkoztatott proliferációs rátája a sejtdenzitás növekedésével csökkent az összes tenyészetben ($p < 0,0001$), kontroll OF vs. bőr * $p = 0,03$, EOP OF vs. bőr ** $p = 0,02$).

6.2. TGF- β kezelés hatása a fibroblastok PAI-1 és HA termelésére

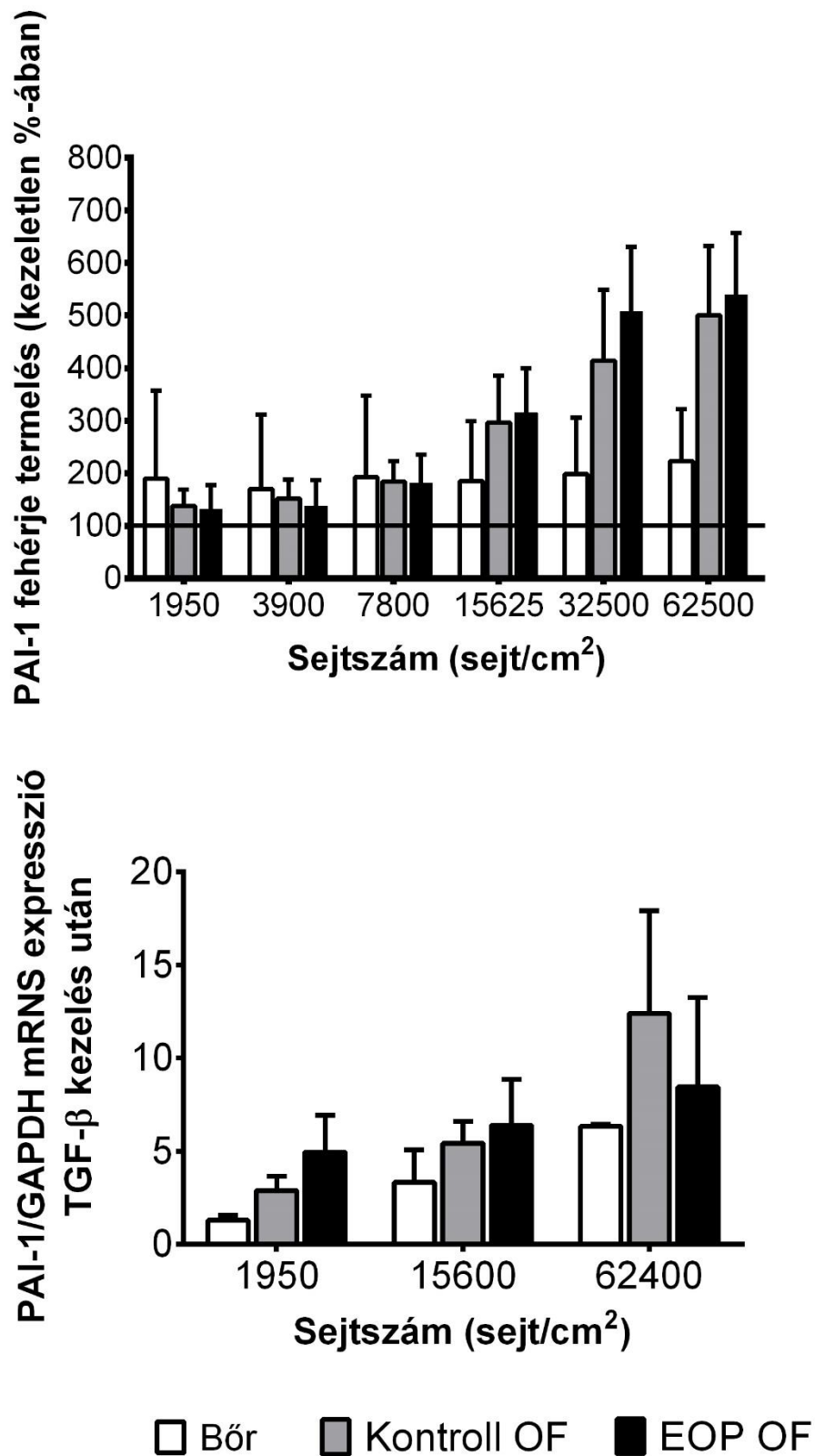
A következő kísérletekben TGF- β kezeléssel egészítettük ki a tápfolyadékot. Az első lépés annak a legkisebb TGF- β koncentrációnak a meghatározása volt, amellyel még kiváltjuk a PAI-1 termelésre gyakorolt maximális emelő hatást. A kísérletek során a TGF- β koncentrációját 0,01–10,0 ng/ml-es tartományban vizsgáltuk (12. ábra), konfluens tenyészetek esetében. Az 1 ng/ml és az ennél magasabb koncentrációk esetében a PAI-1 termelésre kifejtett hatás már nem különbözött szignifikánsan egymástól 24 órás kezelést követően, ezért választottuk az 1 ng/ml értéket a további vizsgálatainkhoz.



12. ábra. A TGF- β koncentráció hatása az orbita fibroblastok PAI-1 szintézisére. 0,01–10,0 ng/ml-es tartományban vizsgáltuk a TGF- β hatását.

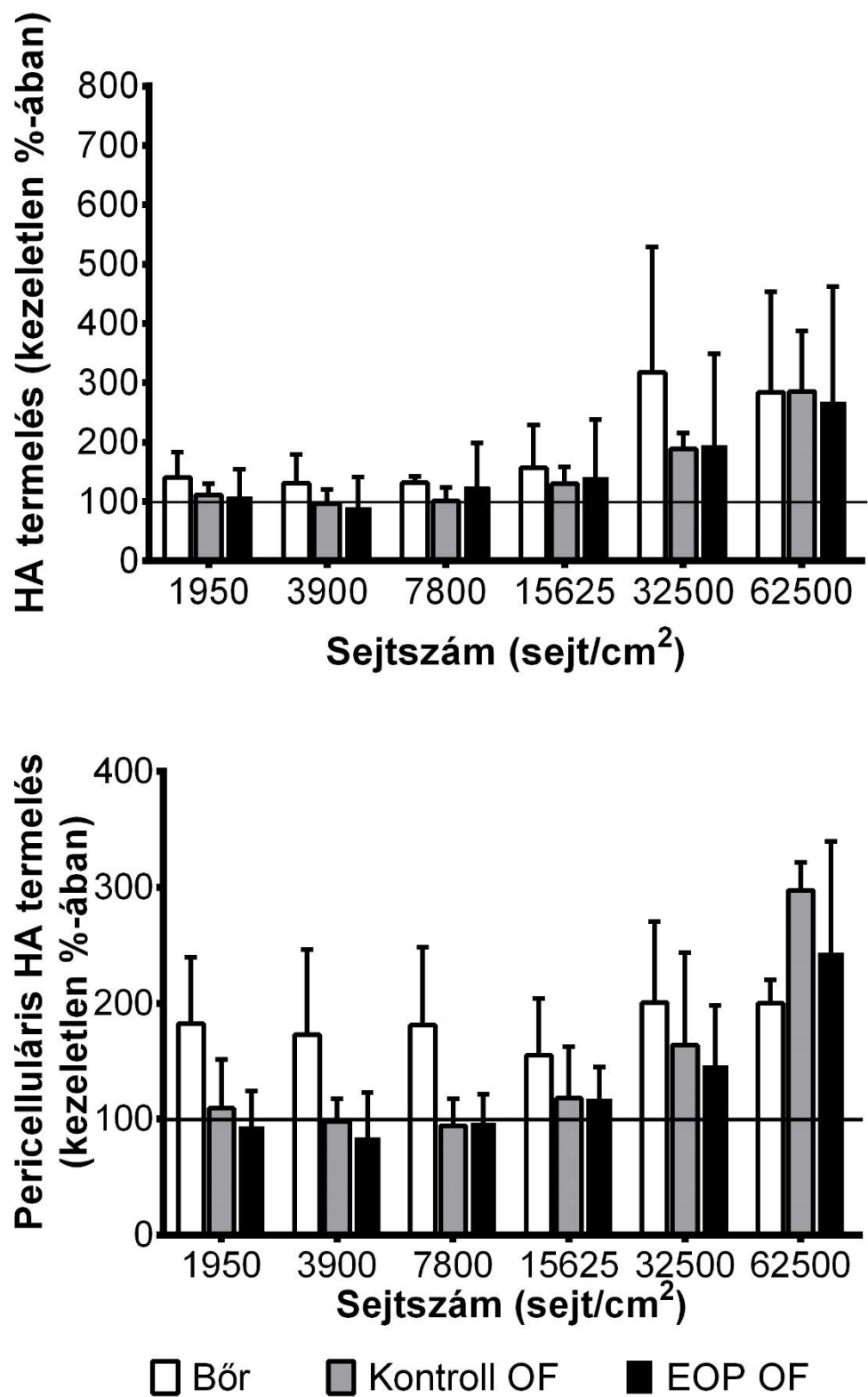
A TGF- β minden denzitáson stimulálta a PAI-1 termelést minden vizsgált sejtvonalon, függetlenül azok származási helyétől ($p < 0,000001$). Mind a kontroll mind pedig a EOP OF esetében a PAI-1 termelés emelkedése függött a sejtdenzitástól ($p < 0,00001$); minél magasabb

a denzitás annál nagyobb PAI-1 termelés fokozódást láttunk (13. ábra, A). A bőr fibroblastok esetében ez a hatás nem érvényesül; a TGF- β kezelésnek a PAI-1 expresszióra kifejtett stimuláló hatásának sejtdenzitásfüggése az OF-ra jellemző, a bőr fibroblastokra nem. A legnagyobb orbita fibroblast denzitások esetében látható, hogy a TGF- β kezelés eredményeképpen 5-szörös növekedést találtunk a PAI-1 mennyiségében. Ugyanaz a mintázat jellemzi a *PAI-1* mRNS szinteket a TGF- β kezelést követően, mint amit a PAI-1 fehérje szintek esetében találtunk (13. ábra, B); minél magasabb a denzitás, annál nagyobb *PAI-1* mRNS expresszió fokozódást láthatunk. A legnagyobb denzitáson átlagosan 10-szeres *PAI-1* mRNS emelkedést tapasztaltunk, így elmondhatjuk, hogy a nagy sejtdenzitás PAI-1 termelést gátló hatása (8. ábra, B) a TGF- β kezeléssel részben visszafordítható.



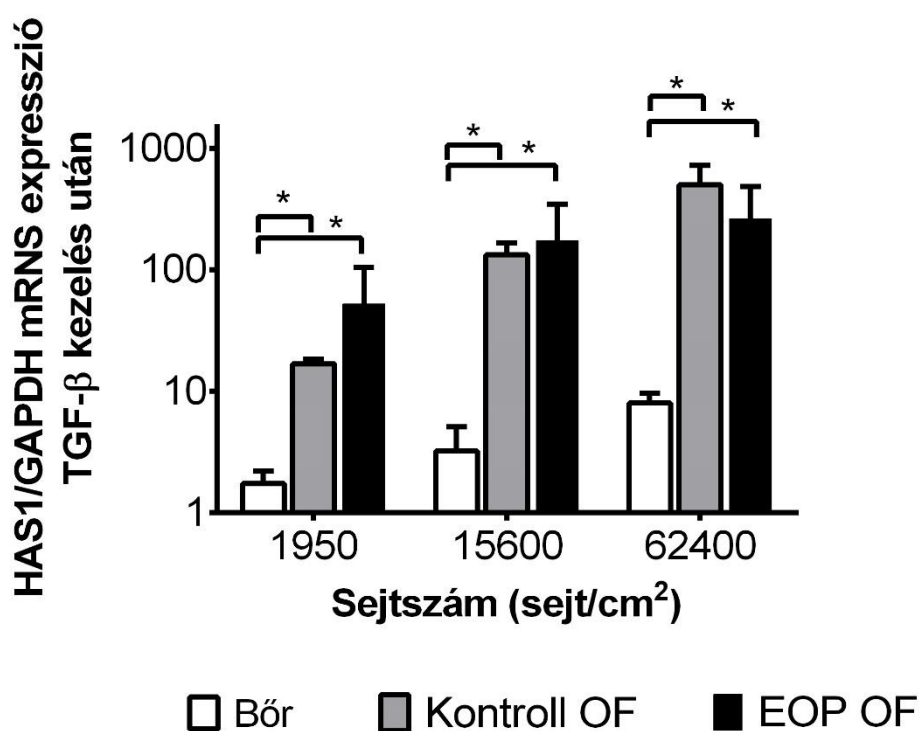
13. ábra. A TGF-β hatása a PAI-1 termelésre és a PAI-1 mRNA expresszióra.
A: A PAI-1 fehérje TGF-β hatására bekövetkező változása sejtdenzitásfüggést mutat. **B:** Az EOP OF és kontroll OF esetén a növekvő sejtdenzitással erősödik a TGF-β PAI-1 mRNA expressziót fokozó hatása.

A TGF- β stimuláló hatását tekintve a legnagyobb denzitáson találtunk különbséget a HA termelésben ($p < 0,0001$) (14. ábra, A), és ez a hatás nem függött a fibroblastok származási helyétől. Ugyanez igaz az OF pericelluláris HA szintézisére is (14. ábra, B), míg a bőr fibroblastok minden denzitáson emelkedett HA szintézissel reagáltak a TGF- β kezelésre. A kezeletlen tenyészetek esetében talált pozitív korreláció a felülúszó HA tartalma és a pericelluláris HA mennyisége között szignifikáns maradt a 24 órás TGF- β kezelést követően is (bőr $r = 0,58$ $p = 0,02$, kontroll $r = 0,95$, $p < 0,000001$, EOP $r = 0,89$, $p < 0,000001$). A prekonfluens és konfluens tenyészetek között nincs különbség a HA termelésben a TGF- β hatására, viszont a posztkonfluens sejtdenzitású tenyészetek válaszreakciója eltér ezektől ($p < 0,0001$).



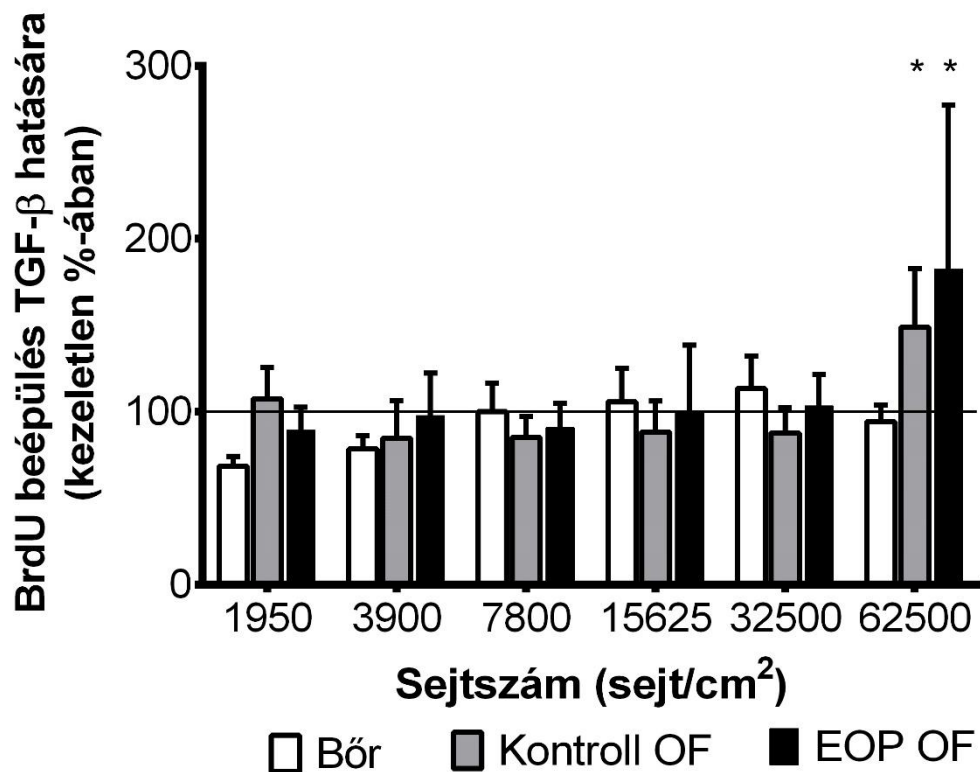
14. ábra. TGF- β hatása a HA termelésre. **A:** A TGF- β kezelés hatására bekövetkező hialuronan termelés változás. A 100% jelenti a kezeletlen tenyészetek hialuronan termelését. **B:** TGF- β csak a legnagyobb orbita fibroblast denzitásokon okozott szignifikáns emelkedést pericelluláris HA szintjében, míg a bőr fibroblastok minden esetben emelkedett HA szintézissel reagáltak a kezelésre.

Az mRNA szintjén folytatva a vizsgálatot azt találtuk, hogy a *HAS1* expressziója sejtdenzitás függő módon emelkedik ($p = 0,03$) kifejezettebben az orbita fibroblastok esetében (15. ábra), ezzel szemben a *HAS2*, *HAS3*, *HYAL1* és *HYAL2* expressziós szintek nem változtak TGF- β kezelés hatására. A növekvő sejtdenzitással erősödik a TGF- β fokozó hatása mindhárom sejtvonal esetében. A *HAS1* mRNA expressziójában az orbita fibroblastok esetében a legnagyobb denzitáson 500-600-szoros növekedést tapasztaltunk, míg a bőr fibroblastok esetén ez csak kb. 10-szeres volt.



15. ábra. TGF- β hatása a *HAS1* mRNA expresszióra. A TGF- β hatására emelkedik a *HAS1* mRNA expressziója minden denzitáson. * $p < 0,05$

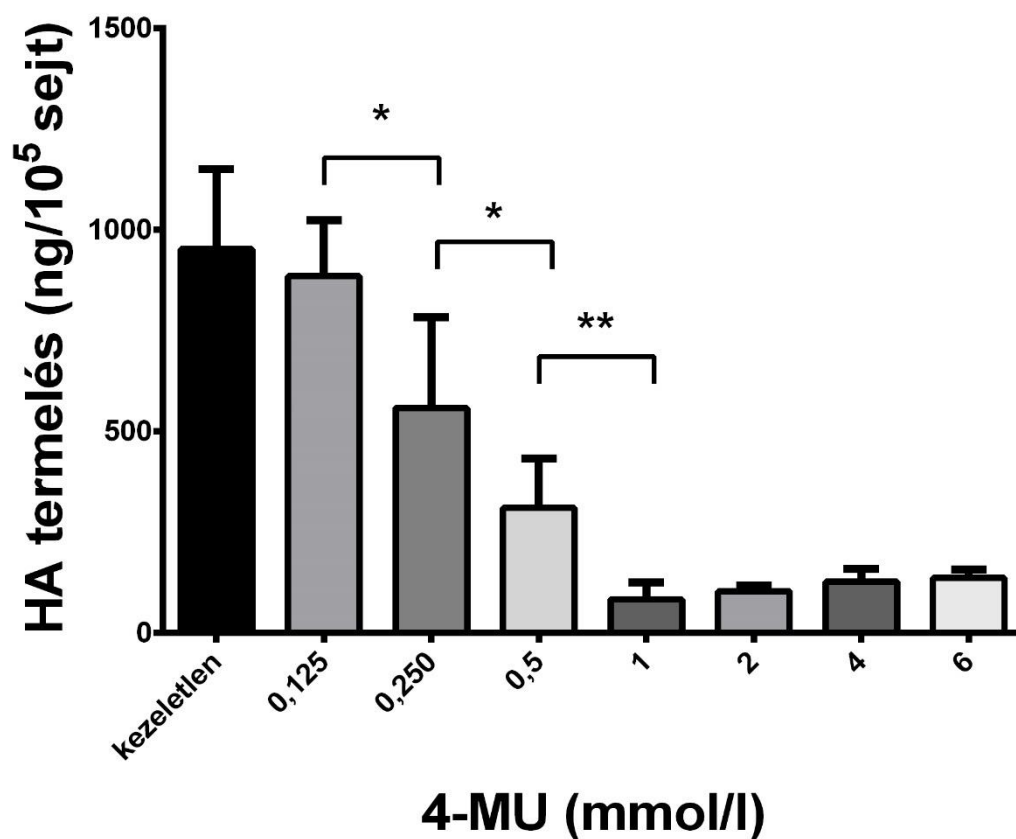
A TGF- β kezelés csak a legnagyobb sejtdenzitáson emelte a proliferációt (16. ábra). A többi denzitás esetében gyenge gátló hatást tapasztaltunk. A legkifejezettebb a bőr fibroblastok legkisebb denzitás értékénél egy 30 %-os csökkenés ($p < 0,01$), és az EOP OF esetében 18 %-os csökkenés ($p = 0,04$).



16. ábra A TGF- β hatása a proliferációra. Csak az OF legnagyobb denzitása esetén figyeltünk meg proliferációs ráta fokozódást (* $p < 0,01$). A többi esetben gyenge gátló hatás látható. A 100 % jelenti a kezeletlen tenyészetek alap BrdU beépülését.

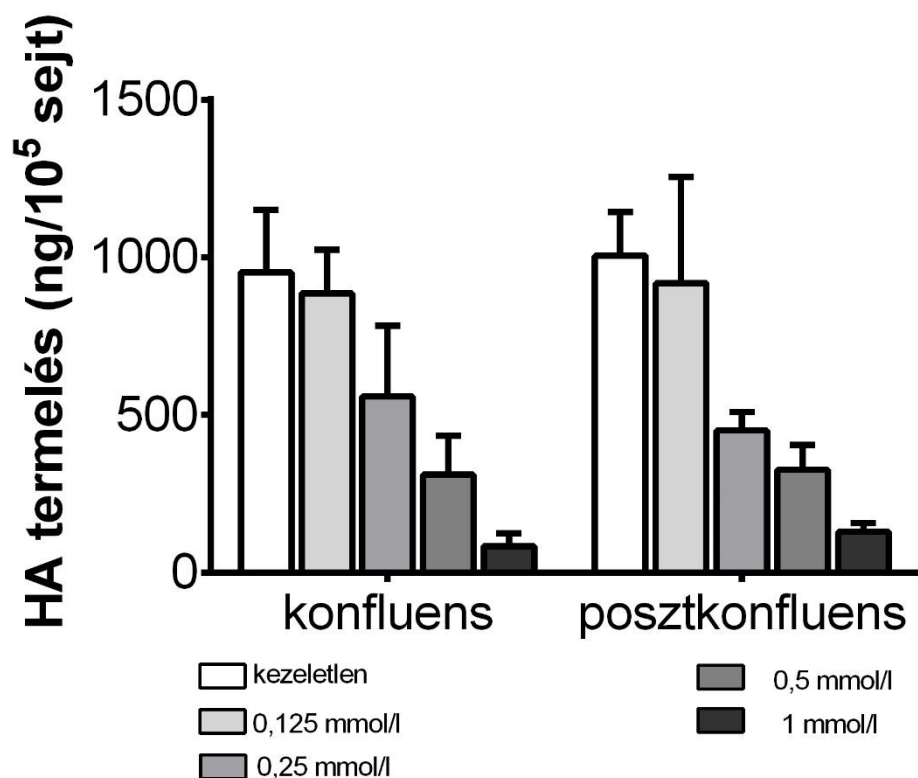
6.3. 4-metilumbelliferon kezelés hatása a fibroblastok HA termelésére

A következő kísérletekben 4-MU kezeléssel egészítettük ki a tápfolyadékot. A kísérletek során a 4-MU koncentrációját 0,125–6,0 mmol/les tartományban vizsgáltuk (17. ábra). A vizsgált koncentráció tartományban az 1 mmol/l koncentráció váltotta ki a maximális hatást 24 órás kezelést követően, ezért választottuk az 1 mmol/l értéket a további vizsgálatainkhoz.



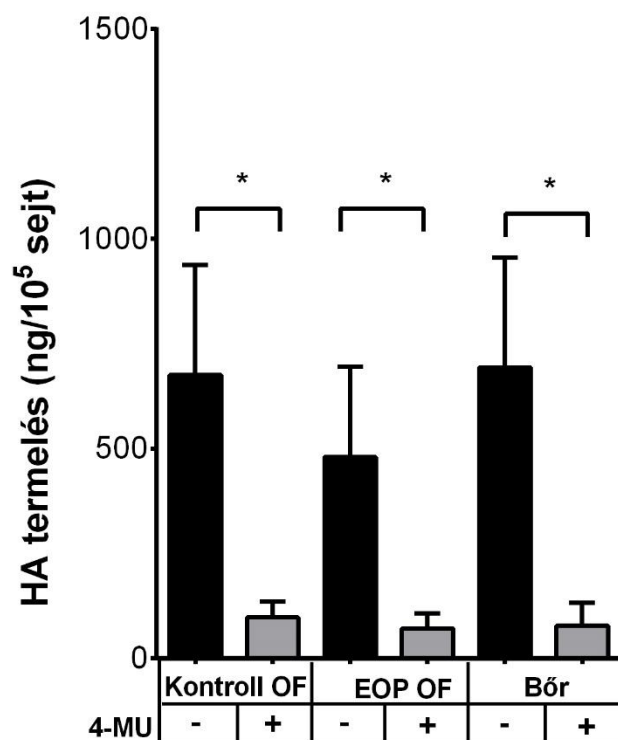
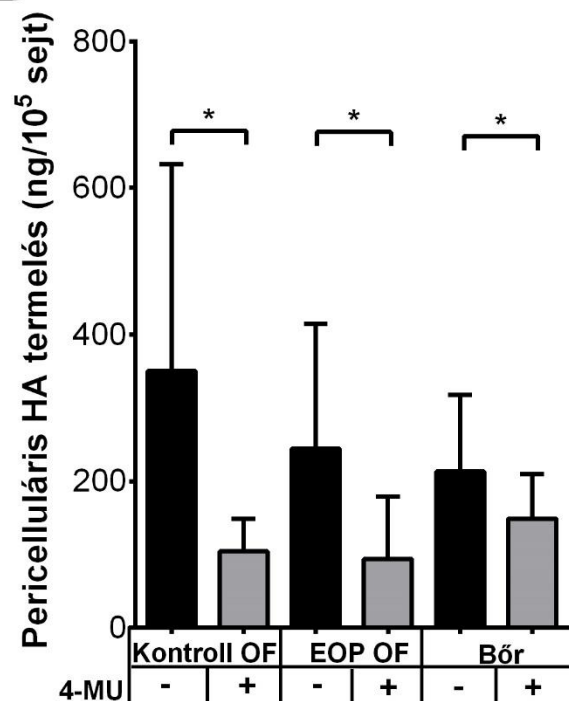
17. ábra. A 4-MU koncentrációjának hatása az orbita fibroblastok HA termelésre. A vizsgált koncentrációk közül az 1 mmol/l átlagosan 87%-os csökkenést váltott ki az orbita fibroblastok HA termelésében * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a 4-MU kezelés hatékonysága függ-e a sejtdenzitástól az orbita fibroblastok esetében. Konfluens ($1,56 \times 10^4$ sejt/cm²) és posztkonfluens ($3,12 \times 10^4$ sejt/cm²) denzitáson tenyésztve (18. ábra), majd 4-MU-val 24 óráig kezelve a sejteket azt az eredményt kaptuk, hogy a 4-MU kezelés hatékonysága független a sejtsűrűségtől ($p = 0,931$).



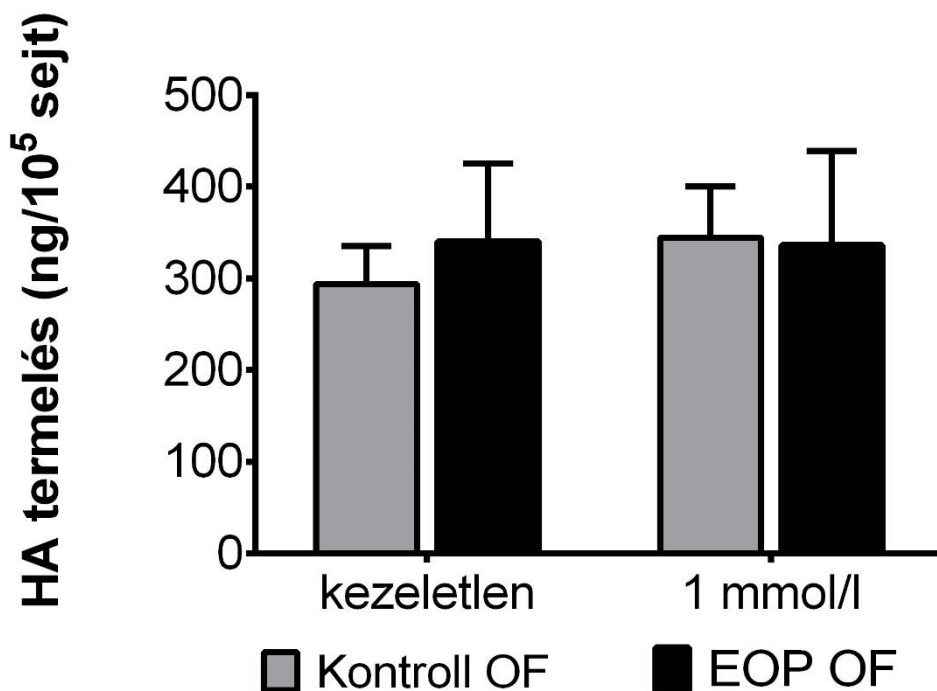
18. ábra. A sejtdenzitás hatása a 4-MU kezelés hatékonyságára. A kezeletlen tenyészetekhez viszonyítva minden sejt típuson szignifikáns csökkenést okozott a kezelés a sejtek származási helyétől függetlenül.

Erős gátló hatást tapasztaltunk, az egységnyi sejt által termelt HA mennyisége csökkent a 4-MU kezelést követően (19. ábra, A). A *post hoc* analízis megmutatta, hogy a 4-MU kezelés eredménye markáns HA termelés csökkenés: a gátlás $85,3 \pm 2,9 \%$ a kontroll OF, $85,4 \pm 2,8 \%$ az EOP OF és $91,3 \pm 1,2 \%$ a bőr fibroblastok esetében. Elmondhatjuk, hogy az 1 mmol/l 4-MU kezelés átlagosan 87,3% csökkenést okozott a HA termelésben. A 4-MU kezelés hatékonysága nem függött a fibroblastok származási helyétől ($p = 0,352$). Ezzel párhuzamosan vizsgáltuk a pericelluláris HA termelést, és ott is különbséget találtunk a kezelést követően OF esetében (19. ábra, B).

A**B**

19. ábra. A 4-MU hatása a HA termelésre. A: A sejtenyésző folyadékba szekretált HA. Kontroll OF * $p < 0,001$, EOP OF * $p < 0,005$ és bőr fibroblastok * $p < 0,001$. **B:** A 4-MU hatása a pericelluláris HA termelésre. A kezeletlen tenyészetekhez viszonyítva minden sejttípuson szignifikáns csökkentés jött létre. * $p < 0,05$.

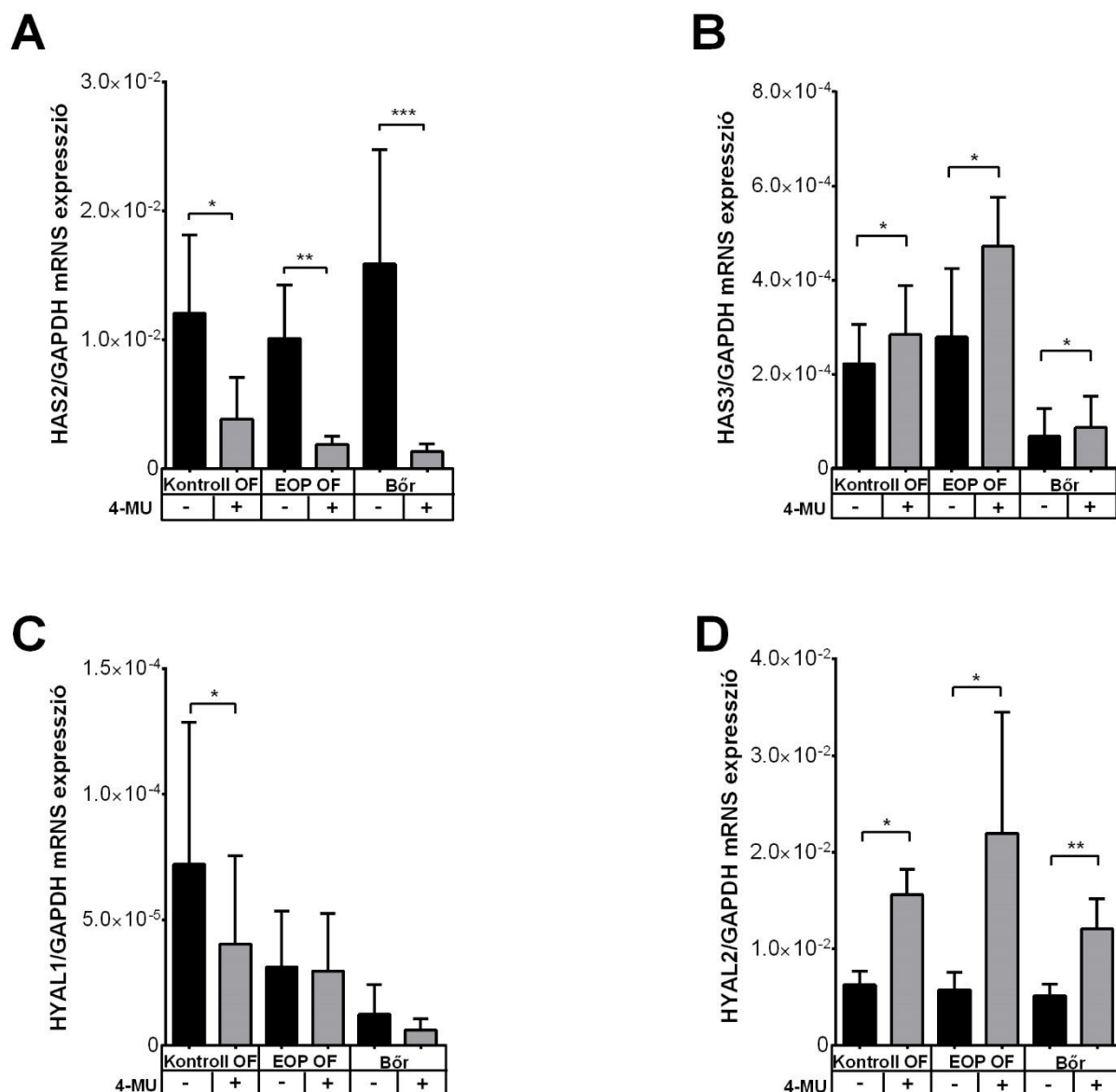
Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a 4-MU kompetitív szubsztrátként viselkedik a HA szintézisben, az emberi szervezetben jelen levő metabolitját, a 4-MUG-ot alkalmaztuk 24 órás kezelés formájában, 1 mmol/l koncentrációban, ugyanolyan feltételek mellett. 4-MUG nem gátolta a HA termelést (20. ábra).



20. ábra. 4-MUG kezelés hatása a HA szintézisre. A 4-MUG nem befolyásolta a fibroblastok HA termelését.

A *HAS1* alap expressziója rendkívül alacsony értéket mutatott minden vizsgált sejtvonalon. Ahogyan a 21. ábra, A része mutatja, nincs szignifikáns különbség az alap *HAS2* expressziókban az eltérő származási helyek függvényében ($p = 0,654$). A 4-MU kezelés minden sejtvonal esetében szignifikánsan csökkentette a *HAS2* expressziót ($p < 0,001$), azonban a hatékonyságban nincs különbség (ANOVA $p = 0,268$). Az átlagos csökkenés $72 \pm 12 \%$, $76 \pm 18 \%$ és $91 \pm 3 \%$ volt a kontroll OF, EOP OF és bőr fibroblastok esetében. A *post hoc* analízis alapján ez a csökkenés minden esetben szignifikáns volt (kontroll OF $p = 0,008$, EOP OF $p = 0,0234$, bőr $p = 0,0012$). A *HAS3* esetében (21. ábra, B) a kezelés szignifikáns emelkedést okozott a fibroblastok *HAS3* termelésében ($p = 0,030$) függetlenül a sejtek

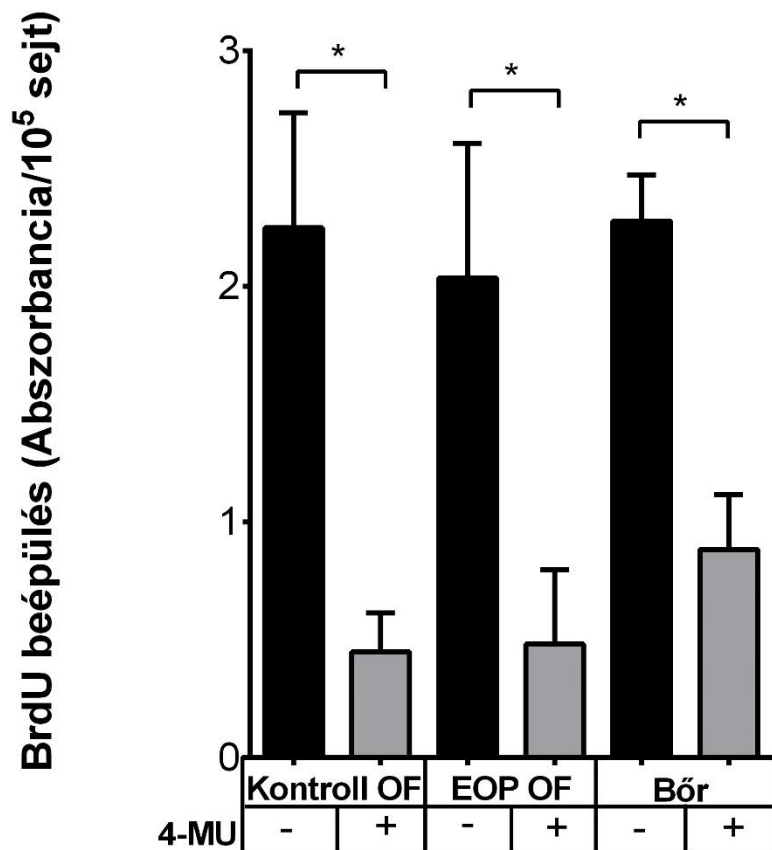
származási helyétől ($p = 0,163$). Az emelkedés az alap expresszióhoz képest átlagosan 36% a kontroll OF, 99% az EOP OF és 34% a bőr fibroblastok esetében. A *HYAL1* esetében az alap expressziók nem különböztek a származási helyük függvényében ($p = 0,203$), és a 4-MU kezelés viszont csökkenést okozott ($p = 0,017$) és a hatékonyság is függött a sejtek eredetétől ($p = 0,042$) (21. ábra, C). A *post hoc* analízis megmutatta, hogy a 4-MU kezelés hatására csak a kontroll OF-ban bekövetkező 45 ± 13 % csökkenés volt szignifikáns. A különböző származási helyű fibroblastok *HYAL2* expressziójában nincs különbség (21. ábra, D) ($p = 0,353$). A 4-MU kezelés emelkedést okozott a *HYAL2* mRNS szintekben ($p < 0,0001$), és ez a hatás független volt a sejtek származási helyétől ($p = 0,368$). A *post hoc* teszt megmutatta, hogy a 4-MU által kiváltott hatás minden sejtvonalon szignifikáns volt. Az emelkedés az alapexpresszióhoz képest 157 ± 72 % a kontroll OF-ben, 160 ± 24 % a EOP OF-ben, és 135 ± 24 % a bőr fibroblastokban.



21. ábra. A 4-MU kezelés hatása a HA szintjét befolyásoló kulcs enzimek expressziójára. A: HAS2 - kontroll OF * $p = 0,008$, EOP OF ** $p = 0,0234$, bőr * $p = 0,0012$, B: HAS3 - * $p = 0,030$, C: HYAL1 - * $p < 0,005$, D: HYAL2 - kontroll OF * $p < 0,001$, EOP OF * $p < 0,001$, bőr ** $p = 0,001$**

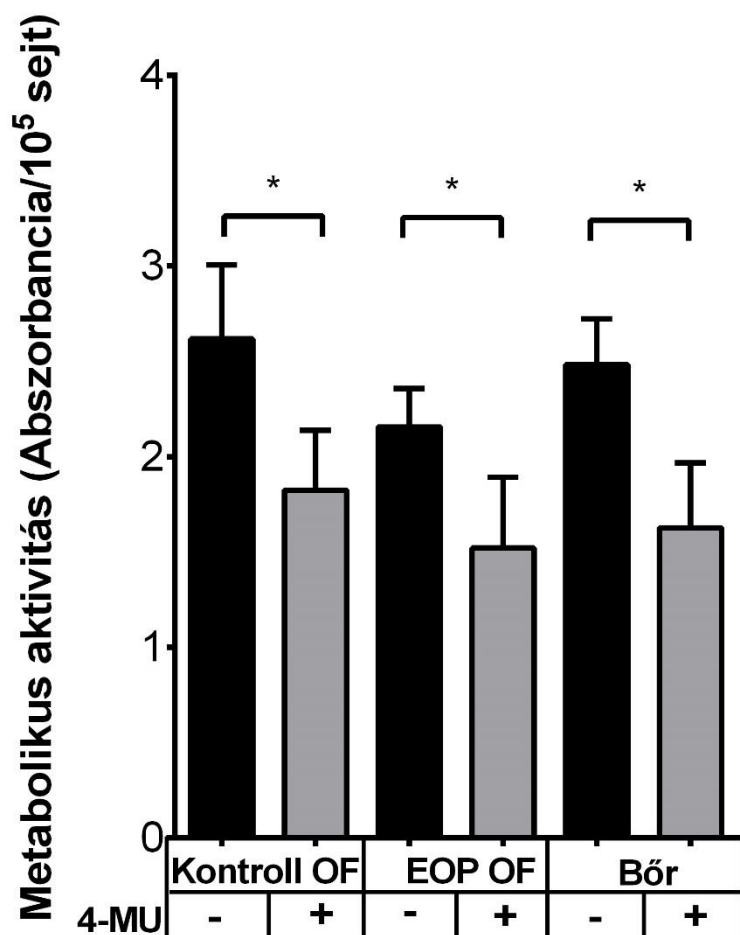
A fibroblastok proliferációs rátája fontos tényező az EOP autoimmun folyamatában. 4-MU hatását a proliferációs potenciálra a BrdU beépülés mértékével vizsgáltuk. 24 órás 4-MU kezelés során a csökkenés $78 \pm 8 \%$ kontroll OF, $61 \pm 12 \%$ EOP OF és $80 \pm 3 \%$ a bőr fibroblastok esetében (22. ábra) a csak tápfolyadékot kapott tenyészetekhez képest. Mind az alap proliferációs ráta, mind pedig a kezelést követően megváltozott proliferációs ráta független

volt a sejtek származási helyétől ($p = 0,387$); a 4-MU kezelés egységes csökkenést okozott ($p < 0,001$) attól függetlenül, hogy bőr eredetű vagy orbita eredetű fibroblastokat kezeltünk ($p = 0,259$).



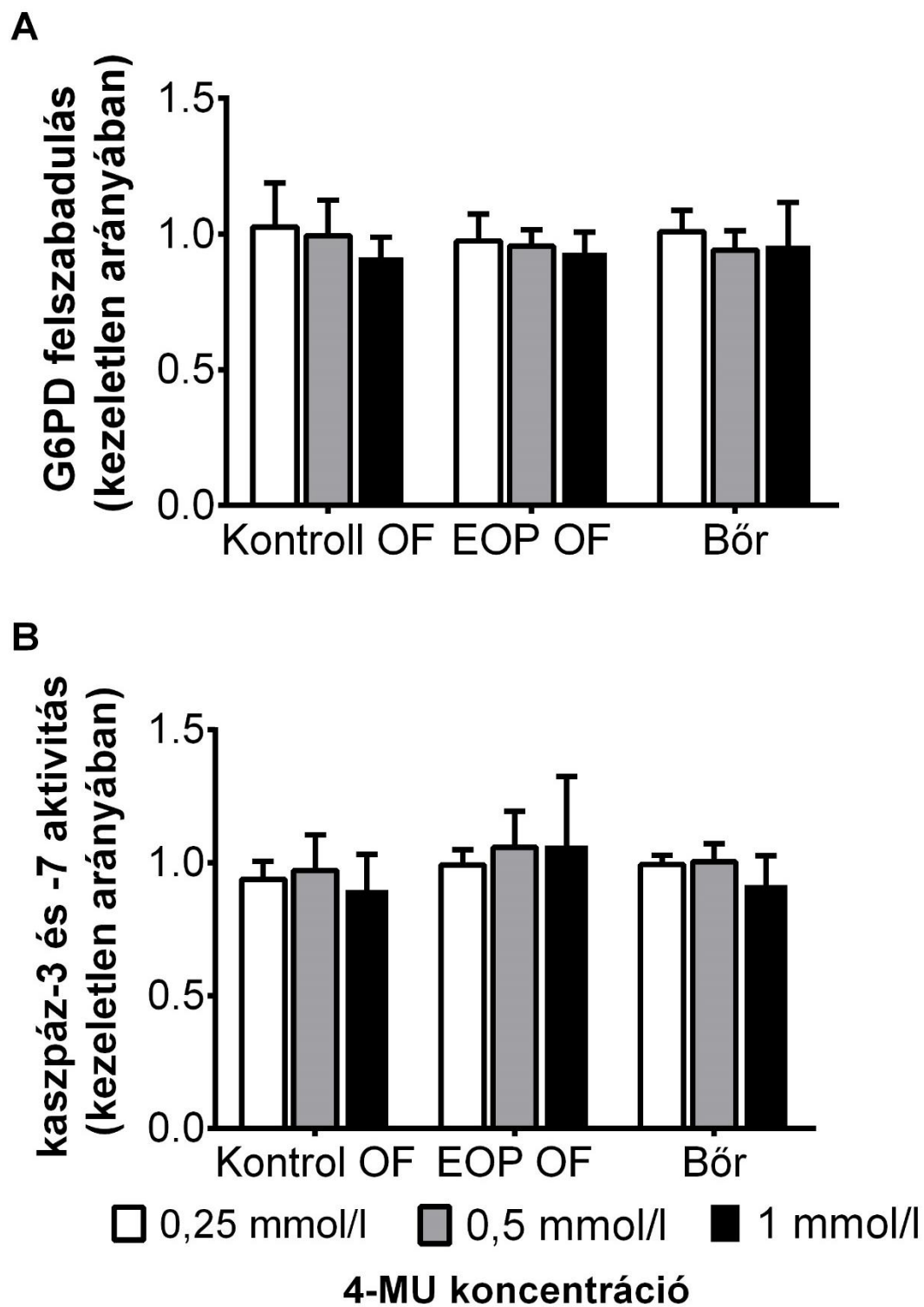
22. ábra. A 4-MU kezelés hatása a proliferációs rátára. Átlagosan 70%-os proliferációs potenciál csökkenést tapasztalunk a 4-MU kezelést követően * $p < 0,001$

Annak megállapítására, hogy toxikus-e az 1 mmol/l 4-MU a sejtekre, metabolikus aktivitás mérést végeztünk. A tetrazólium formazánná történő konverziója csökkent a 4-MU kezelés hatására: 29 ± 18 % kontroll OF-ban, 34 ± 11 %, az EOP OF-ban, és 30 ± 10 % bőr fibroblastokban (23. ábra). A hatás nem függött a sejtek származási helyétől.



23. ábra A 4-MU kezelés hatása a metabolikus aktivitásra. A 4-MU kezelés hatására a sejtek származási helyétől függetlenül ($p = 0,356$) csökken a sejtek metabolikus aktivitása * $p < 0,0001$.

Annak igazolására, hogy a proliferációban és metabolikus aktivitásban látható csökkenés nem a 4-MU kezelés következtében kialakuló direkt citotoxikus hatás következménye, citotoxicitás vizsgálatot végeztünk. Ez a próba a sejtekből apoptózis vagy nekrosis esetén felszabaduló G6PD enzim reakcióján alapul. A kezeletlen tenyészetek esetében a nekrosis/apoptózis mértéke $3,8 \pm 3,5 \%$, míg a 4-MU kezelés után $5,7 \pm 5,5\%$, azaz a sérült vagy halott sejtek aránya nem tért el a kezeletlen, illetve a 4-MU-val kezelt sejtvonalak esetében ($p = 0,316$). Annak bizonyítására, hogy a 4-MU kezelés nem mutat pro-apoptotikus aktivitást, kaszpáz-3 és kaszpáz-7 aktivitás mérést is végeztünk; 24 órás kezelést követően nem találtunk különbséget az aktivitásokban (24. ábra).

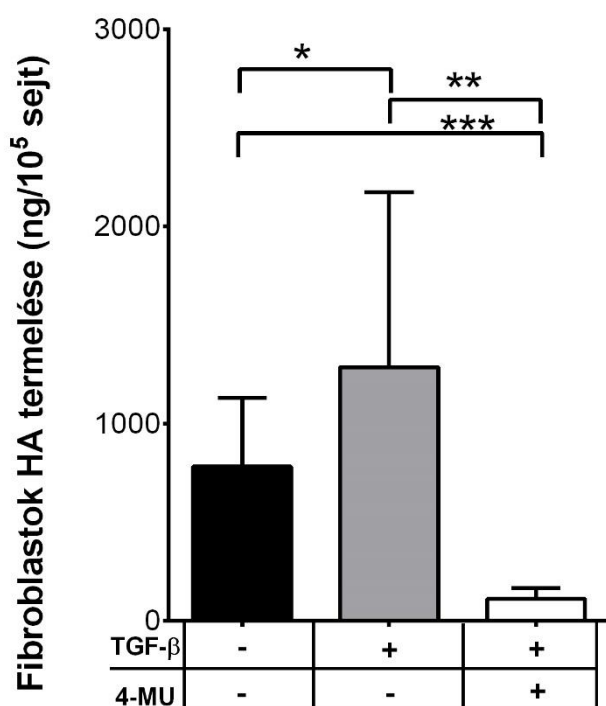
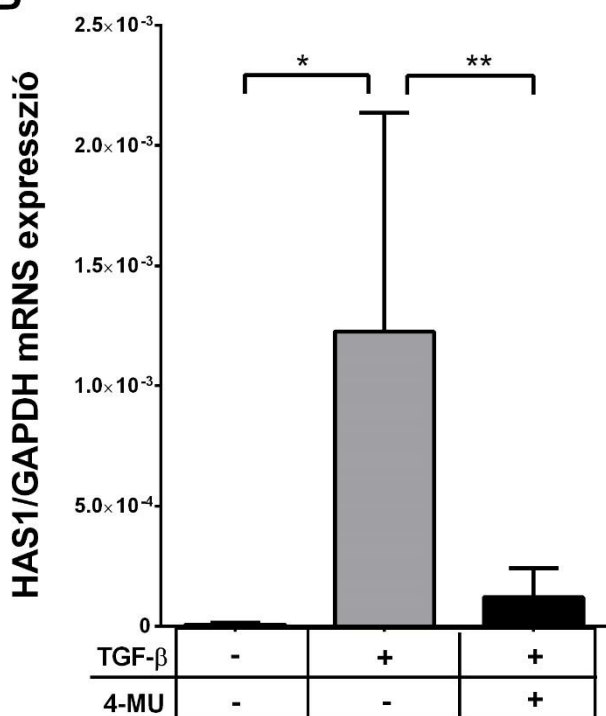


24. ábra. A 4-MU apoptózist vagy nekrozist okozó hatásának vizsgálata. **A:** G6PD felszabadulás. **B:** Kaspáz aktivitás.

6.4. 4-metilumbelliferon és TGF- β kezelés együttes hatása

A TGF- β által kiváltott HA termelés növekedés minden vizsgált sejtvonal esetében szignifikáns volt (5.2 fejezet). Tisztázni szeretnénk volna, hogy az EOP pathogenesisében szereplő TGF- β hatás 4-MU-val kivédhető-e.

A 4-MU+TGF- β együttes kezelés során a 4-MU kivédte a TGF- β stimuláló hatását, és a kiindulási HA szint alá csökkentette a szintézist. Ebből a szempontból nem volt különbség a különböző származási helyű fibroblastok között ($p = 0,242$), ezért összevontan ábrázoltuk őket (25. ábra, A). A TGF- β által kiváltott *HAS1* mRNS expresszió növekedés csökkent 4-MU kezelés hatására (25. ábra, B). A *HAS2* és *HAS3*, illetve a *HYAL1* és *HYAL2* esetében viszont nem találtunk különbséget a TGF- β stimulált és a kezeletlen sejtek között.

A**B**

25. ábra. A 4-MU és TGF-β együttes kezelése az fibroblastok HA termelésére és HAS1 mRNA expressziójára. A: HA termelés, kezeletlen vs. TGF-β kezelt * $p = 0,036$, TGF-β kezelt vs. TGF-β + 4-MU kezelt *** $p < 0,0001$, kezeletlen vs. TGF-β + 4-MU kezelt ** $p < 0,005$. **B:** HAS1 mRNA expresszió * $p < 0,01$, ** $p = 0,034$.

7. Megbeszélés

Az orbita fibroblastokat tekinthetjük a EOP-ban zajló autoimmun folyamat elsődleges célpontjának, mivel az orbita kötőszövetet infiltráló immunsejtek által termelt cytokinek aktiválni képesek azokat (1, 32). Az aktivált orbita fibroblastok nagy mennyiségben termelik az ECM komponenseit és fokozottan proliferálnak (7). A HA a legnagyobb mennyiségben termelt GAG a csontos orbitában a EOP lefolyása során (1, 2, 97). A HA felhalmozódása az orbitában önmagában, de magas vízkötő képessége miatt még kifejezettebben, a szövetek duzzanatát idézi elő (98) és elősegíti a gyulladásos immunsejtek infiltrációját (99, 100). A plazminogén aktivátor rendszer – a hemosztázisban betöltött szerepe mellett – kulcsfontosságú szerepet játszik az ECM átrendeződésében, számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban (101). A PAI-1 a legfőbb negatív regulátora a plazminogén-plazmin átalakulásának, így gátolja a fibrinolízist és plazmin-függő pericelluláris proteolízist (60); szabályozza a sejtek adhézióját, migrációját és a sebgyógyulást. Ennek következtében az egyensúly fenntartása az ECM szintézise és degradációja között jelentős részben a PAI-1 feladata. Emellett a sejt-sejt kapcsolatok is szabályozzák a proliferációt és a PAI-1 expressziót (64, 102). Az EOP pathomechanizmusa során a HA túltermelése lazább, nagy víztartalmú környezetet hoz létre, ami hatással van a sejt-sejt és a sejt-ECM kapcsolatokra.

Kísérleteinkkel kimutattuk, hogy a növekvő sejtdenzitás negatív regulátora az orbita fibroblastok PAI-1 termelésének és proliferációs potenciáljának, függetlenül attól, hogy azok kontroll vagy EOP orbita kötőszövetből származnak. Az osztódás kontakt gátlása a sejtek általános jellemzője (103), mely folyamatosan aktív, ezzel szabályozva a sejtek proliferációját és a szervek méretét (104). Feltételezzük, hogy az általunk létrehozott rendszerben a konfluens tenyészetek modellezik az egészséges orbitában található sejteket,

míg a prekonfluens tenyészetek hasonlítanak a kiterjedő, magas ECM termelésű, magasabb proliferációs rátával rendelkező fibroblastokra. Azt találtuk, hogy mind az EOP, mind a kontroll orbita fibroblastok, magasabb proliferációs kapacitással rendelkeznek, mint a bőr fibroblastok (11. ábra). Más kutatócsoportok is hasonló eredményre jutottak a hasonló körülmények között tartott konfluens fibroblast tenyészetekkel kapcsolatban (37). A mi kísérleteink során intenzív, transzkripciós szinten szabályzott PAI-1 szintézist találtunk, mely a sejtdenzitással párhuzamosan változott mind a bőr, mint pedig az orbita fibroblastok esetében; az egységnyi sejtre jutó PAI-1 termelés fordítottan arányos a sejtsűrűséggel (8. ábra, A). Ez megegyezik a más munkacsoportok által hasonló, de nem orbita eredetű sejttenyészeteken végzett kísérletek eredményeivel (62, 64). Crandall és munkatársai subcutan és omentális humán preadipocyta PAI-1 termelését vizsgálták 10^5 - 10^6 sejt közötti denzitásokon. A legkisebb denzitáson (10^5 sejt) kb 12500 ng/ 10^6 sejt PAI-1 fehérjét mértek, mely a növekvő denzitással párhuzamosan csökkent $7 \cdot 10^5$ sejt denzitásig, ahol 2000 ng/ 10^6 sejtre csökkent a PAI-1 fehérje mennyisége. Ennél magasabb denzitás értékeken már nem változott a PAI-1 szintje a felülszóban (62). Tudomásunk szerint kutatócsoportunk elsőként írta le, hogy az orbita fibroblastok is hasonlóan viselkednek (105). Feltételezzük, hogy az orbita fibroblastok proliferációs állapota a különböző denzitások esetében a PAI-1 expresszió fő meghatározója; az emelkedett PAI-1 szintézis a G0 - G1 átmenetben a pericelluláris proteolízis gátlásával az egyik lehetséges támogató mechanizmus a proliferáció számára. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy milyen más transzkripciós faktoroknak lehet szerepe a PAI-1 expresszióban az orbita fibroblastokban. Feltételezzük, hogy a TGF- β lehet az egyik olyan citokin, amely felelős az orbita kötőszövetben bekövetkező változásokért. A TGF- β -ről ismert, hogy transzkripciós szinten szabályozza a sejt növekedést, a sejtek mozgását, a ECM átalakulását és a pericelluláris proteolitikus aktivitást (106); az is tudott, hogy stimulálja a PAI-1 transzkripcióját és – nem orbita

eredetű szövetekben – képes fokozni olyan gének átírását, amelyek az ECM komponenseit kódolják, például a fibronektin, a kollagén-I és proteoglikánok (107, 108). Ezen túlmenően, a TGF- β bizonyítottan jelen van a EOP betegek orbitájában (35). Eredményeink azt mutatják, hogy a TGF- β a PAI-1 szintézis potenciális stimulátora az orbita fibroblastokban minden vizsgált sejtdenzitáson, a PAI-1 szintjében ötszörös emelkedést okozva a magas denzitásokon (13. ábra, A). A TGF- β által kiváltott sejtdenzitás függő PAI-1 termelés fokozódás más transzkripciós faktorokkal történő együttműködés, kölcsönhatás következtében alakulhat ki (109). Úgy véljük, hogy a magas PAI-1 koncentráció az EOP orbitákban a megnövekedett mátrix stabilitásáért felelős, ezzel hozzájárulva az ECM mennyiségének és a fibroblastok proliferációs potenciáljának növekedéséhez.

A más munkacsoportok által mért eredmények nehezen hasonlíthatók a mi mérési eredményeinkhez, mivel sok esetben más sejttípuson, kizárólag konfluens tenyészeteken sejteken, részletesen nem definiált közegben végezték a kísérleteket. A mi rendszerünkben fontos tényező a meghatározott sejtszám, sejtdenzitás, ezért is normalizáltuk eredményeinket 10^5 sejtre, és így adtuk meg a termelt PAI-1 és HA mennyiségét a felülúszóban. A HA eredményeket tekintve nem mindegy, hogy milyen technikával történik a mérés, pl. [H^3]-GAG beépüléssel, ELISA-val vagy gél-elektroforézissel. Haserodt és munkatársai 3 különböző gyártó által forgalmazott HA ELISA-t hasonlított össze, és arra a következtetésre jutottak, hogy az a meghatározó az eredmények tekintetében, hogy milyen fragment hosszúságú HA standardot tartalmaz a kit (110). A kísérleteink során több ismétlést alkalmaztunk, és minden esetben ugyanúgy történt a kivitelezés, így egy azon vizsgálaton belül csak egyféle mérési módszert használtunk. A saját eredményeink minden esetben összehasonlíthatóak a korábbi vagy később végzett kísérletek eredményeivel.

Az orbita fibroblastok megnövekedett HA szintézisét már korábban leírták 96 lyukú plate-ben konfluens tenyészteken szérummentes tápfolyadékban TGF- β hatására, és azt találták,

hogy az alap HA termelés (kb. 15 ng/10⁴ sejt) 12-szeresére (kb. 165 ng/10⁴ sejt) emelkedett TGF- β hatására (99) . Eredményeink azt mutatják, hogy az egységnyi sejtre jutó HA termelés nem mutat sejtdenzitás függő mintázatot, de nagyban függ a fibroblastok származási helyétől (9. ábra, A). Ezt támasztja alá, hogy az egyes HAS enzimek expressziós mintázata különbözik a három sejttípus esetében (10. ábra, A, B és C). A HAS-ok transzkripció szintjén bekövetkező változások nem mindig korrelálnak a HA szekrécióval (111). A sejtfelületen a HYAL2 kezdi meg a HA molekula lebontását kisebb méretű fragmentekre, amelyeket a HYAL1 bont tovább (44). Annak ellenére, hogy a *HAS3*-nak magasabb az expressziós szintje és ennek van a legmagasabb aktivitása, ennél alacsonyabb a *HYAL1* expressziója, mégis alacsonyabb HA termelést figyeltünk meg a EOP OF esetében, mint a kontroll OF-oknál. Ez az eredményünk hasonló ahhoz, amit mások is leírtak (112) . A sejtek TGF- β kezelésre megnövekedett HA termeléssel (14. ábra, A) válaszoltak a magasabb denzitásokon, és ezzel párhuzamosan a PAI-1 termelésük is növekedett (13. ábra, A). Mivel mind az EOP, mind a kontroll OF azonos módon reagáltak a TGF- β -ra, azt feltételezzük, hogy az immunsejtek és a cytokinek jelenléte az, ami hozzájárul a betegség pathogenesiséhez, nem pedig esetleges különbség az EOP és a kontroll orbita szövetek között. Megerősítettük, hogy a TGF- β kezelés fokozza a *HAS1* mRNS expressziót (15. ábra). A betegség lefolyása szempontjából a TGF- β hatására bekövetkező mátrix túltermelés a magasabb denzitásokon hátrányosan hathat. A HA felhalmozódása kikapcsolhatja a kontakt-gátlást és emelkedett proliferációs potenciált válthat ki (113). A HA koncentrációfüggő módon emeli a PAI-1 expressziót a humán simaizom sejtekben, $0,97 \pm 0,22$ ng/ μ g PAI-1 fehérje termelést találtak, mely már 0,01 mg/ml HA hozzáadását követően szignifikánsan emelkedett ($p < 0,05$) (114), és pozitív korrelációt találtak a HA és a PAI-1 aktivitása között amikor humán aorta endothel sejteket inkubáltak C-reaktív proteinnel ($r = 0,49$, $p < 0,05$) (115). Az emberi köldökzsinór véna

endothel sejtekben a nagy molekulású HA stimulálja a TGF- β receptor-I aktivációt és a PAI-1 expresszióját (116). Ezekkel a korábbi eredményekkel összevetve a mi adataink azt mutatják, hogy a TGF- β indukálta HA szintézis a magasabb sejtdenzitásokon elősegíti a sejtdenzitás függő PAI-1 stimulációt orbita fibroblastokban. Eredményeink alapján a kontakt gátlás fontos negatív regulátora az orbita fibroblastok PAI-1 szintézisének.

A magas proliferációs ráta kapcsolatban állhat a PAI-1 szintézissel (8. ábra, A és 11. ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy a növekvő sejtdenzitás által okozott PAI-1 szintézis csökkenés TGF- β által részlegesen feloldható (8. ábra, A és 13. ábra, A). Az EOP pathogenesis szempontjából jelentős, hogy a PAI-1 képes közvetlenül elősegíteni a macrophágok és a T-sejtek infiltrációját (106), emellett a plazminogén-plazmin átalakulás csökken, és ebből adódóan a ECM degradációja is csökken. A PAI-1 és eddig nem azonosított faktorok általi ECM stabilizálás fokozódhat a helyi cytokin felszaporodás következtében, így további cytokinek esnek „csapdába”, és az EOP klinikai képe súlyosbodhat. A PAI-1 képes a TGF- β látens formáját aktiválni (60) *circulus vitiosus*-hoz vezetve..

Az orbita fibroblastok HA termelése nem függ a kontakt gátlástól és a proliferációtól. A túlzott mennyiségben történő HA termelés EOP-ban az orbitában termelődő cytokinek hatása jön létre. Az OF bizonyos cytokinekre emelkedett HA produkcióval és megnövekedett proliferációval reagálnak; azt találtuk, hogy a TGF- β -nak a nagyobb sejtsűrűségeken ilyen hatása van. A HA felhalmozódása stimuláló környezetet biztosít a fibroblastok további proliferációjához és leukociták infiltrációjához (108).

Céljaink között szerepelt egy olyan hatóanyag azonosítása, mely képes a megnövekedett HA szintézis gátlására, még stimulált körülmények között is. A 4-MU-t jelenleg sikeresen alkalmazzák autoimmun betegségek állatmodelljein a folyamat befolyásolására (76, 117, 118). Összhangban a korábban más sejtvonalakon végzett kutatásokkal (6, 119) azt találtuk, hogy a 4-MU gátolja az orbita és a bőr fibroblastok HA termelését, így ez kiinduló pontot adhat további

kísérletek felé. A 4-MU-ról ismert, hogy a HA szintézis kompetitív szubsztrátja. Eredményeink alapján, a 4-MU jelenléte nemcsak a HA molekulák alegységekből való szintézisére van hatással, hanem az orbita fibroblastok hialuronan szintázainak és a hialuronidázainak transzkripciós szintjeire is. Bár a 4-MU markánsan csökkenti a HA termelést, teljes gátlást nem értünk el; a maximális gátlás 80% volt a vizsgált sejtvonalakon, ez az eredmény megegyezik a Rilla és munkatársai által tapasztaltakkal, akik 83 %-os csökkenést értek el 4-MU kezelést követően a HA termelésében epidermális keratinocyták esetében (120). A HA szintézist befolyásoló hatás független a fibroblastok származási helyétől: a kontroll, az EOP és a bőr fibroblastok egyforma mennyiségű HA-t termeltek alap (kezeletlen) körülmények között, és 4-MU hatására minden esetben szignifikánsan csökkent a HA mennyisége a felülúszóban (19. ábra, A). Li és munkatársai bizonyítékot találtak arra, hogy a 4-MU anti-inflammatorikus hatással is rendelkezik, azáltal, hogy gátolja az NF- κ B aktivációt, így csökkentve a felszabaduló pro-inflammatorikus cytokinek mennyiségét (121). Fontos, hogy a csökkent HA szintézis kapcsolatban áll az erősen csökkenő proliferációs potenciállal; patkány epidermális keratinocyták esetében 0,2 mM 4-MU kezelést követően (sejtszámra vonatkoztatva) 50 %-os csökkenést találtak a proliferációban, míg 0,5 mM esetében teljesen leállt a proliferációja ezen sejteknek (120), amit a mi eredményeink is megerősítenek (19. ábra, A és 22. ábra). Ez a két tényező hozzájárulhat ahhoz, hogy a 4-MU-t, mint potenciális terápiás szert használhassuk az EOP kezelésében.

Az anatómiai származási helytől függ a fibroblastok hialuronan szintáz expressziós mintázata. Azt találtuk, hogy a bőr fibroblastok magasabb HAS1 expresszióval rendelkeznek, mint a kontroll orbita vagy EOP orbita fibroblastok. A HAS3 mintázata csökkenő sorrendben EOP OF > kontroll OF > bőr fibroblastok (105). Megerősítettük azt is, hogy a HAS2 a legnagyobb mennyiségben expresszálandó izoformája az enzimnek, ami a HA termelésért felelős az orbita fibroblastokban (122); az mRNS koncentrációja két nagyságrenddel nagyobb mint a másik két

izoforma (HAS1, HAS3) esetében. Zhang és munkatársai azt találták subcutan preadipocyták vizsgálata során, hogy a HAS2 ($304,8 \pm 116,2$ TCN/1000 APRT (transzkripció másolat szám/1000 adenzin phosphoribozil transzferáz (APRT)) egy nagyságrenddel nagyobb mértékben expresszáldott mint a HAS1 ($34,5 \pm 13$ TCN/1000 APRT) és a HAS3 ($20,8 \pm 7,1$ TCN/1000 APRT) és megállapították, hogy nem a csökkent HA degradáció felelős a HA mennyiségének a növekedéséért, hanem a HAS enzimek túlermelődése (123).

Eredményeink alapján a 4-MU még TGF- β által stimulált körülmények között is képes a bőr és orbita fibroblastok HA termelésének csökkentésére (25. ábra, A). A 4-MU közvetlen hatásának mechanizmusa a HAS génjeire egyelőre tisztázatlan. Korábban leírták hogy a HAS1 és HAS2 expressziók pozitív korrelációt mutatnak az UDP-GlcUA és UDP-GlcNac sejten belüli szintjeivel, viszont a HAS3 semmilyen korrelációt nem mutat az intracelluláris UDP-glükóz szintekkel (51). Vizsgálatunkban a 4-MU szignifikánsan csökkentette a HAS1 és HAS2 expressziót, miközben a HAS3 szintje változatlan maradt (21. ábra, A, B és C). Ismert, hogy a 4-MU az „UDP-glükóz éhezés” kialakításával meggátolja a HAS-ok plazmamembránba történő transzlokációját, ahol a HA szintézis történne, így a kompetitív szubsztrátkénti gátlást tovább fokozza (124). A HAS-ok mellett a 4-MU a hialuronidázok expresszióját is gátolja (21. ábra, D és E). A HYAL2 a sejtfelszínhez kihorgonyozottan található és közepes méretű HA fragmenteket készít a nagy molekulásúlyú HA molekulákból, míg a HYAL1 intracellulárisan illetve a vérplazmában található meg (125). A HYAL1 minden méretű HA molekulát képes bontani és nagyon kis HA fragmenteket generál (44, 126). A degradáció eredménye többféle, változatos méretű HA fragment, melyeknek különböző biológiai folyamatokban van szerepük. Emelkedett HYAL2 (21. ábra, E) expressziót találtunk a 4-MU kezelés hatására, amely gyorsíthatja a HA lebontás első lépéseit, és ez kedvező hatású lehet az EOP lefolyása során. A HA szintézis gátlásával a sejtciklus lefolyása is gátlást szenvedhet, amint azt osteoszarkóma sejteken 4-MU használatával kimutatták (127). Tumor sejteken a 4-MU befolyásolja a

proliferációt és a motilitást az Akt foszforilációjának akadályozásával a HA - PI3K/Akt szignalizációs útvonalon. Az antiapoptotikus PI3K/Akt útvonal gátlása hozzájárulhat az apoptózis indukálásához (127-130). Eredményeink azt mutatják, hogy 24 órás 4-MU kezelés nem fokozza az apoptózist sem az orbita, sem a bőr fibroblast tenyészetek esetében (24. ábra, A és B), de további vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy hosszabb expozíció milyen hatást vált ki. Vizsgálataink alapján a maximális gátló hatás eléréséhez szükséges 4-MU koncentráció nem toxikus a sejtekre nézve. A citotoxicitás vizsgálatokat estében megjegyezzük, hogy a formazán átalakuláson alapuló metabolikus aktivitás vizsgálat túlbecsülheti a 4-MU hatását a sejt életképesség szempontjából.

A 4-MU fent említett tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy az EOP kezelésében egy ígéretes új irányba indulhassunk el. Munkánk során igazoltuk, hogy a 4-MU legalább két módon avatkozik be a fibroblast aktivációba, a proliferáció csökkentésével és a HA szintézis gátlásával. Mivel a szöveti mikrokörnyezet és annak HA tartalma hozzájárul a helyi gyulladásos folyamatok fenntartásához (131), így a 4-MU kedvezően befolyásolhatja az EOP kialakulását és lefolyását. A 4-MU kezelés hatással van a sejt-sejt kölcsönhatásokra, amelyek az antigén prezentációban fontosak, és gátolja a T-sejt proliferációt is (132). A betegség késői fázisában lehet jelentősége annak, hogy a 4-MU befolyásolja az adipogenezist is (133). 3T3-L1 fibroblastokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy a 4-MU kezelés gátolja az adipogenezist (134), illetve csökkenti a felhalmozódó zsír mennyiségét és a zsírsejtek méretét is (135). Az adipogenezisről ismert, hogy HA felhalmozódás és az emelkedett *HAS2* expresszió kíséri (123). Munkám egyik potenciális gyenge pontja a megfigyelések *in vitro* jellege. Az emberi orbitában sokkal összetettebb a környezet: az immun, endokrin és lokális faktorok, a nagyobb szöveti nyomás és a vérrellátás csökkenése együttesen vannak jelen. Mindazonáltal ezen tényezők bármelyike potenciális beavatkozási pont lehet a betegség pathomechanizmusa során.

8. Összefoglalás

Az endocrin orbitopathia (EOP) az autoimmun pajzsmirigybetegségek gyakori szövődménye, mely jelentős életminőség romlással, súlyos esetben látásvesztéssel jár. A hialuronan (HA) túltermelés a betegség jelentős pathogenetikai faktora. A HA-nak kulcsfontosságú szerepe van az orbita kötőszövet és a külső szemizmok autoimmun gyulladásában.

Kimutattuk, hogy az orbita fibroblastok (OF) sejtdenzitás-növekedése negatív regulátora a proliferációnak és a plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) szekréciónak kontroll orbitából és EOP orbitából származó fibroblastokon egyaránt. A növekvő sejtdenzitással csökkent az egységnyi sejt által termelt PAI-1 mennyisége és mRNS expressziója minden vizsgált sejtvonal esetében, míg a fibroblastok által termelt, egységnyi sejtre eső HA mennyisége nem mutatott denzitásfüggést. A negatív szabályzó hatás részben gátolható volt transzformáló növekedési faktor β -val (TGF- β). A TGF- β stimulálta a PAI-1 expressziót, és ez a hatás a növekvő sejtdenzitással orbita fibroblastok esetén fokozódik, míg a bőr fibroblastoknál nincs jelen. A TGF- β hatására növekvő HA termelés *in vivo* csökkentheti a sejtdenzitást, feloldhatja a kontakt gátlást és a proliferáció fokozódásához vezethet, amit az emelkedett PAI-1 szintézis támogat. A vizsgált fibroblastok HA termelését minden esetben csökkentette a 4-metilumbelliferon (4-MU) kezelés. A 4-MU csökkentette a hialuronan szintáz 2 (HAS2) és növelte a hialuronan szintáz 3 (HAS3) és hialuronidáz 2 (HYAL2) expresszióját minden sejtvonal esetében, míg a hialuronidáz 1 (HYAL1) expresszió nem változott. Az EOP és a kontroll orbitából származó fibroblastok hasonlóan viselkedtek: a 4-MU gátolta mind a bazális, mind pedig a TGF- β stimulált HA termelést és csökkentette a proliferációs potenciált minden vizsgált fibroblast esetében. Az EOP-nak nincs megfelelő állatmodellje, így klinikai vizsgálatok szolgálhatnak további információval a 4-MU gyógyszerként történő alkalmazhatóságáról EOP-ban.

9. Summary

Endocrine orbitopathy (EOP) is an autoimmune disorder of retroocular tissues which may accompany Graves' disease (GD). In addition to leading to decrease in quality of life, in severe cases, it may result in loss of vision. Hyaluronan (HA) overproduction is a major factor in the pathogenesis of EOP, playing a key role in the autoimmune inflammation of the orbital connective tissue and external eye muscles.

We have shown that the increasing cell density of orbital fibroblasts is a negative regulator of proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) secretion in both control orbital and EOP orbital fibroblasts. With increasing cell density, the amount of PAI-1 protein and mRNA expression per cell decreased in all examined cell lines, while the amount of HA per cell produced by fibroblasts did not show density dependence. The negative regulatory effect of increasing cell density was partially reversed by transforming growth factor β (TGF- β). TGF- β stimulated *PAI-1* expression, and this effect is more marked with increasing cell density in orbital fibroblasts, while was missing in dermal fibroblasts. Increased HA production by TGF- β may reduce contact inhibition, and lead to increased proliferation rate, which is further enhanced by elevated PAI-1 synthesis.

HA production of the fibroblasts was reduced in all cell lines after 4-methylumbelliferone (4-MU) treatment. 4-MU decreased hyaluronan synthase 2 (HAS2) and increased hyaluronan synthase 3 (HAS3) and hyaluronidase 2 (HYAL2) expressions, while hyaluronidase 1 (HYAL1) expression remained unchanged. EOP fibroblasts and fibroblasts from control orbits behaved similarly: 4-MU inhibited both basal and TGF- β -stimulated HA production and reduced proliferative potential in all fibroblast lines examined.

Any intervention that reduces HA overproduction may be beneficial in EOP. As no suitable animal model of EOP is available, clinical trials should provide additional information on 4-MU's applicability as a treatment option.

10. Irodalomjegyzék

1. Bahn RS 2010 Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* **362**:726-738.
2. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA 1989 Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr Rev* **10**:366-391.
3. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ 2003 Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* **24**:802-835.
4. Smith HW, Marshall CJ 2010 Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:23-36.
5. Hargittai I, Hargittai M 2008 Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* **19**:697-717.
6. Nagy N, Kuipers HF, Frymoyer AR, Ishak HD, Bollyky JB, Wight TN, Bollyky PL 2015 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Front Immunol* **6**:123.
7. Wang Y, Smith TJ 2014 Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**:1735-1748.
8. Bahn RS 2016 Graves' disease syndrome: a need for unified therapy. *J Transl Int Med* **4**:61-63.
9. Choi W, Li Y, Ji YS, Yoon KC 2018 Oxidative stress markers in tears of patients with Graves' orbitopathy and their correlation with clinical activity score. *BMC Ophthalmol* **18**:303.
10. Barrio-Barrio J, Sabater AL, Bonet-Farriol E, Velazquez-Villoria A, Galofre JC 2015 Graves' Ophthalmopathy: VISA versus EUGOGO Classification, Assessment, and Management. *J Ophthalmol* **2015**:249125.
11. Bakó G, Lenkey A, Szabó T, Karanyi Z, Forizs E, Kálmán K, Szabó J, Varvölgyi C, Leövey A 1987 Follow up of Graves' patients thyroid stimulating antibody activity during treatment. A prospective study. *Radiobiol Radiother (Berl)* **28**:600-604.
12. Nagy EV, Toth J, Kaldi I, Damjanovich J, Mezosi E, Lenkey A, Toth L, Szabo J, Karanyi Z, Leovey A 2000 Graves' ophthalmopathy: eye muscle involvement in patients with diplopia. *Eur J Endocrinol* **142**:591-597.
13. Bahn RS 2015 Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res* **47**:773-778.
14. Smith TJ, Hegedus L 2016 Graves' Disease. *N Engl J Med* **375**:1552-1565.
15. Gerding MN, Terwee CB, Dekker FW, Koornneef L, Prummel MF, Wiersinga WM 1997 Quality of life in patients with Graves' ophthalmopathy is markedly decreased: measurement by the medical outcomes study instrument. *Thyroid* **7**:885-889.
16. Burch HB, Wartofsky L 1993 Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocr Rev* **14**:747-793.
17. Stan MN, Garrity JA, Bahn RS 2012 The evaluation and treatment of graves ophthalmopathy. *Med Clin North Am* **96**:311-328.
18. Werner SC 1977 Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* **44**:203-204.
19. Mourits MP, Koornneef L, Wiersinga WM, Prummel MF, Berghout A, van der Gaag R 1989 Clinical criteria for the assessment of disease activity in Graves' ophthalmopathy: a novel approach. *Br J Ophthalmol* **73**:639-644.
20. Dolman PJ, Rootman J 2006 VISA Classification for Graves orbitopathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* **22**:319-324.
21. Grubeck-Loebenstien B, Trieb K, Sztankay A, Holter W, Anderl H, Wick G 1994 Retrobulbar T cells from patients with Graves' ophthalmopathy are CD8+ and specifically recognize autologous fibroblasts. *J Clin Invest* **93**:2738-2743.
22. Otto E, Forster G, Kuhlemann K, Hansen C, Kahaly GJ 1996 TSH receptor in endocrine autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* **14 Suppl 15**:S77-84.
23. Feldon SE, Park DJ, O'Loughlin CW, Nguyen VT, Landskroner-Eiger S, Chang D, Thatcher TH, Phipps RP 2005 Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:3913-3921.

24. Smith TJ, Koumas L, Gagnon A, Bell A, Sempowski GD, Phipps RP, Sorisky A 2002 Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:385-392.
25. Koumas L, Smith TJ, Phipps RP 2002 Fibroblast subsets in the human orbit: Thy-1+ and Thy-1- subpopulations exhibit distinct phenotypes. *Eur J Immunol* **32**:477-485.
26. Smith TJ, Janssen J 2019 Insulin-like Growth Factor-I Receptor and Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocr Rev* **40**:236-267.
27. Khoo TK, Coenen MJ, Schiefer AR, Kumar S, Bahn RS 2008 Evidence for enhanced Thy-1 (CD90) expression in orbital fibroblasts of patients with Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* **18**:1291-1296.
28. Weetman AP, Cohen S, Gatter KC, Fells P, Shine B 1989 Immunohistochemical analysis of the retrobulbar tissues in Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* **75**:222-227.
29. Pappa A, Lawson JM, Calder V, Fells P, Lightman S 2000 T cells and fibroblasts in affected extraocular muscles in early and late thyroid associated ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* **84**:517-522.
30. Dik WA, Virakul S, van Steensel L 2016 Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res* **142**:83-91.
31. Longo CM, Higgins PJ 2019 Molecular biomarkers of Graves' ophthalmopathy. *Exp Mol Pathol* **106**:1-6.
32. van Steensel L, Paridaens D, van Meurs M, van Hagen PM, van den Bosch WA, Kuijpers RW, Drexhage HA, Hooijkaas H, Dik WA 2012 Orbit-infiltrating mast cells, monocytes, and macrophages produce PDGF isoforms that orchestrate orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E400-408.
33. Valyasevi RW, Jyonouchi SC, Dutton CM, Munsakul N, Bahn RS 2001 Effect of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and transforming growth factor-beta on adipogenesis and expression of thyrotropin receptor in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:903-908.
34. Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF 2003 TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**:280-287.
35. Pawlowski P, Reszec J, Eckstein A, Johnson K, Grzybowski A, Chyczewski L, Mysliwiec J 2014 Markers of inflammation and fibrosis in the orbital fat/connective tissue of patients with Graves' orbitopathy: clinical implications. *Mediators Inflamm* **2014**:412158.
36. Wynn TA 2008 Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**:199-210.
37. Heufelder AE, Bahn RS 1994 Modulation of Graves' orbital fibroblast proliferation by cytokines and glucocorticoid receptor agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**:120-127.
38. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ 1996 Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:3428-3431.
39. Valyasevi RW, Erickson DZ, Harteneck DA, Dutton CM, Heufelder AE, Jyonouchi SC, Bahn RS 1999 Differentiation of human orbital preadipocyte fibroblasts induces expression of functional thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:2557-2562.
40. Smith TJ 2005 Insights into the role of fibroblasts in human autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* **141**:388-397.
41. Tammi MI, Day AJ, Turley EA 2002 Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* **277**:4581-4584.
42. Toole BP, Wight TN, Tammi MI 2002 Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem* **277**:4593-4596.
43. Toole BP 2004 Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **4**:528-539.
44. Girish KS, Kemparaju K 2007 The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci* **80**:1921-1943.
45. Heldin P, Lin CY, Kolliopoulos C, Chen YH, Skandalis SS 2018 Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biol*.
46. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P 1998 The CD44 protein family. *Int J Biochem Cell Biol* **30**:299-305.

47. Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J 2000 Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. *Int J Oncol* **17**:927-932.
48. Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A 2014 Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol* **35**:8-13.
49. Monslow J, Govindaraju P, Puré E 2015 Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front Immunol* **6**:231.
50. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, Shinomura T, Hamaguchi M, Yoshida Y, Ohnuki Y, Miyauchi S, Spicer AP, McDonald JA, Kimata K 1999 Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* **274**:25085-25092.
51. Rilla K, Oikari S, Jokela TA, Hyttinen JM, Kärnä R, Tammi RH, Tammi MI 2013 Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3. *J Biol Chem* **288**:5973-5983.
52. Ghosh S, Hoselton SA, Dorsam GP, Schuh JM 2015 Hyaluronan fragments as mediators of inflammation in allergic pulmonary disease. *Immunobiology* **220**:575-588.
53. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S 2018 Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)* **10**.
54. Lee-Sayer SS, Dong Y, Arif AA, Olsson M, Brown KL, Johnson P 2015 The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells. *Front Immunol* **6**:150.
55. Wight TN 2017 Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. *Matrix Biol* **60-61**:38-56.
56. Gushulak L, Hemming R, Martin D, Seyrantepe V, Pshezhetsky A, Triggs-Raine B 2012 Hyaluronidase 1 and beta-hexosaminidase have redundant functions in hyaluronan and chondroitin sulfate degradation. *J Biol Chem* **287**:16689-16697.
57. Stuhlmeier KM, Pollaschek C 2004 Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation. *J Biol Chem* **279**:8753-8760.
58. Horton MR, Olman MA, Bao C, White KE, Choi AM, Chin BY, Noble PW, Lowenstein CJ 2000 Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L707-715.
59. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH 1997 Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* **278**:672-675.
60. Ghosh AK, Vaughan DE 2012 PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* **227**:493-507.
61. Reilly CF, Fujita T, Mayer EJ, Siegfried ME 1991 Both circulating and clot-bound plasminogen activator inhibitor-1 inhibit endogenous fibrinolysis in the rat. *Arterioscler Thromb* **11**:1276-1286.
62. Crandall DL, Quinet EM, Morgan GA, Busler DE, McHendry-Rinde B, Kral JG 1999 Synthesis and secretion of plasminogen activator inhibitor-1 by human preadipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:3222-3227.
63. McFarland KL, Glaser K, Hahn JM, Boyce ST, Supp DM 2011 Culture medium and cell density impact gene expression in normal skin and abnormal scar-derived fibroblasts. *J Burn Care Res* **32**:498-508.
64. Tanaka S, Nakao K, Sekimoto T, Oka M, Yoneda Y 2013 Cell density-dependent nuclear accumulation of ELK3 is involved in suppression of PAI-1 expression. *Cell Struct Funct* **38**:145-154.
65. Qi L, Allen RR, Lu Q, Higgins CE, Garone R, Staiano-Coico L, Higgins PJ 2006 PAI-1 transcriptional regulation during the G0 --> G1 transition in human epidermal keratinocytes. *J Cell Biochem* **99**:495-507.
66. Levin EG, Santell L 1987 Conversion of the active to latent plasminogen activator inhibitor from human endothelial cells. *Blood* **70**:1090-1098.
67. Małgorzewicz S, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J 2013 Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med* **31**:503-510.
68. McAnulty RJ 2007 Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:666-671.

69. Smith TJ, Ahmed A, Hogg MG, Higgins PJ 1992 Interferon-gamma is an inducer of plasminogen activator inhibitor type 1 in human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* **263**:C24-29.
70. Planck T, Parikh H, Brorson H, Martensson T, Asman P, Groop L, Hallengren B, Lantz M 2011 Gene expression in Graves' ophthalmopathy and arm lymphedema: similarities and differences. *Thyroid* **21**:663-674.
71. Cao HJ, Hogg MG, Martino LJ, Smith TJ 1995 Transforming growth factor-beta induces plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human orbital fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**:1411-1419.
72. Hogg MG, Evans CH, Smith TJ 1995 Leukoregulin induces plasminogen activator inhibitor type 1 in human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* **269**:C359-366.
73. Wang HS, Tung WH, Tang KT, Wong YK, Huang GJ, Wu JC, Guo YJ, Chen CC 2005 TGF-beta induced hyaluronan synthesis in orbital fibroblasts involves protein kinase C betaII activation in vitro. *J Cell Biochem* **95**:256-267.
74. Ongchai S, Somnoo O, Kongdang P, Peansukmanee S, Tangyuenyong S 2018 TGF-beta1 upregulates the expression of hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis in culture models of equine articular chondrocytes. *J Vet Sci* **19**:735-743.
75. Edward M, Quinn JA, Pasonen-Seppänen SM, McCann BA, Tammi RH 2010 4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors. *Br J Dermatol* **162**:1224-1232.
76. Nagy N, Kaber G, Johnson PY, Gebe JA, Preisinger A, Falk BA, Sunkari VG, Gooden MD, Vernon RB, Bogdani M, Kuipers HF, Day AJ, Campbell DJ, Wight TN, Bollyky PL 2015 Inhibition of hyaluronan synthesis restores immune tolerance during autoimmune insulinitis. *J Clin Invest* **125**:3928-3940.
77. Bartalena L, Tanda ML 2009 Clinical practice. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* **360**:994-1001.
78. Bartalena L 2013 Diagnosis and management of Graves disease: a global overview. *Nat Rev Endocrinol* **9**:724-734.
79. Szumowski P, Abdelrazek S, Zukowski L, Mojsak M, Sykala M, Siewko K, Maliszewska K, Poplawska-Kita A, Mysliwiec J 2019 Efficacy of (99m)Tc-DTPA SPECT/CT in diagnosing Orbitopathy in graves' disease. *BMC Endocr Disord* **19**:10.
80. Galuska L, Leovey A, Szucs-Farkas Z, Garai I, Szabo J, Varga J, Nagy EV 2002 SPECT using 99mTc-DTPA for the assessment of disease activity in Graves' ophthalmopathy: a comparison with the results from MRI. *Nucl Med Commun* **23**:1211-1216.
81. Hales IB, Rundle FF 1960 Ocular changes in Graves' disease. A long-term follow-up study. *Q J Med* **29**:113-126.
82. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson A, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, Mourits M, Perros P, Boboridis K, Boschi A, Curro N, Daumerie C, Kahaly GJ, Krassas GE, Lane CM, Lazarus JH, Marino M, Nardi M, Neoh C, Orgiazzi J, Pearce S, Pinchera A, Pitz S, Salvi M, Sivelli P, Stahl M, von Arx G, Wiersinga WM 2008 Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO. *Eur J Endocrinol* **158**:273-285.
83. Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, Eckstein A, Kahaly GJ, Marcocci C, Perros P, Salvi M, Wiersinga WM 2016 The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy Guidelines for the Management of Graves' Orbitopathy. *Eur Thyroid J* **5**:9-26.
84. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Bruno-Bossio G, Lepri A, Pinchera A 1991 Orbital radiotherapy combined with high dose systemic glucocorticoids for Graves' ophthalmopathy is more effective than radiotherapy alone: results of a prospective randomized study. *J Endocrinol Invest* **14**:853-860.
85. Balazs C, Kiss E, Vamos A, Molnar I, Farid NR 1997 Beneficial effect of pentoxifylline on thyroid associated ophthalmopathy (TAO)*: a pilot study. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:1999-2002.
86. Türke B, Balázs C 2012 [Treatment of pretibial myxoedema with pentoxifylline]. *Orv Hetil* **153**:1719-1722.
87. Kotwal A, Stan M 2018 Current and Future Treatments for Graves' Disease and Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res* **50**:871-886.

88. Bartalena L, Marcocci C, Tanda ML, Rocchi R, Mazzi B, Barbesino G, Pinchera A 2002 Orbital radiotherapy for Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* **12**:245-250.
89. Meyer Zu Horste M, Pateronis K, Walz MK, Alesina P, Mann K, Schott M, Esser J, Eckstein AK 2016 The Effect of Early Thyroidectomy on the Course of Active Graves' Orbitopathy (GO): A Retrospective Case Study. *Horm Metab Res* **48**:433-439.
90. Pescovitz MD 2006 Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* **6**:859-866.
91. Salvi M, Vannucchi G, Campi I, Rossi S, Bonara P, Sbrozzi F, Guastella C, Avignone S, Pirola G, Ratiglia R, Beck-Peccoz P 2006 Efficacy of rituximab treatment for thyroid-associated ophthalmopathy as a result of intraorbital B-cell depletion in one patient unresponsive to steroid immunosuppression. *Eur J Endocrinol* **154**:511-517.
92. El Fassi D, Nielsen CH, Hasselbalch HC, Hegedus L 2006 Treatment-resistant severe, active Graves' ophthalmopathy successfully treated with B lymphocyte depletion. *Thyroid* **16**:709-710.
93. Erdei A, Paragh G, Kovacs P, Karanyi Z, Berenyi E, Galuska L, Lenkey A, Szabados L, Gyory F, Ujhelyi B, Berta A, Boda J, Berta E, Bodor M, Gazdag A, Nagy EV 2014 Rapid response to and long-term effectiveness of anti-CD20 antibody in conventional therapy resistant Graves' orbitopathy: A five-year follow-up study. *Autoimmunity* **47**:548-555.
94. Douglas RS, Kahaly GJ, Patel A, Sile S, Thompson EH, Perdok R, Fleming JC, Fowler BT, Marcocci C, Marinò M, Antonelli A, Dailey R, Harris GJ, Eckstein A, Schiffman J, Tang R, Nelson C, Salvi M, Wester S, Sherman JW, Vescio T, Holt RJ, Smith TJ 2020 Teprotumumab for the Treatment of Active Thyroid Eye Disease. *N Engl J Med* **382**:341-352.
95. Ye X, Bo X, Hu X, Cui H, Lu B, Shao J, Wang J 2017 Efficacy and safety of mycophenolate mofetil in patients with active moderate-to-severe Graves' orbitopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **86**:247-255.
96. Bahn RS, Gorman CA, Woloschak GE, David CS, Johnson PM, Johnson CM 1987 Human retroocular fibroblasts in vitro: a model for the study of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **65**:665-670.
97. Hufnagel TJ, Hickey WF, Cobbs WH, Jakobiec FA, Iwamoto T, Eagle RC 1984 Immunohistochemical and ultrastructural studies on the exenterated orbital tissues of a patient with Graves' disease. *Ophthalmology* **91**:1411-1419.
98. Natt N, Bahn RS 1997 Cytokines in the evolution of Graves' ophthalmopathy. *Autoimmunity* **26**:129-136.
99. Guo N, Woeller CF, Feldon SE, Phipps RP 2011 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit transforming growth factor-beta-induced, hyaluronan-dependent, T cell adhesion to orbital fibroblasts. *J Biol Chem* **286**:18856-18867.
100. Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT, Wight TN 2012 Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol* **31**:90-100.
101. Mignatti P, Rifkin DB 1993 Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* **73**:161-195.
102. Comi P, Chiaramonte R, Maier JA 1995 Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* **219**:304-308.
103. Küppers M, Ittrich C, Faust D, Dietrich C 2010 The transcriptional programme of contact-inhibition. *J Cell Biochem* **110**:1234-1243.
104. Zeng Q, Hong W 2008 The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* **13**:188-192.
105. Galgoczi E, Jeney F, Gazdag A, Erdei A, Katko M, Nagy DM, Ujhelyi B, Steiber Z, Gyory F, Berta E, Nagy EV 2016 Cell density-dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF- β in orbital fibroblasts. *J Endocrinol* **229**:187-196.
106. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ 2013 TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal* **25**:264-268.
107. Matrisian LM, Hogan BL 1990 Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol* **24**:219-259.
108. Wight TN, Potter-Perigo S 2011 The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**:G950-955.

109. Samarakoon R, Higgins PJ 2008 Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* **100**:976-983.
110. Haserodt S, Aytekin M, Dweik RA 2011 A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available Hyaluronan ELISA-like assays. *Glycobiology* **21**:175-183.
111. Itano N, Kimata K 2002 Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* **54**:195-199.
112. Krieger CC, Gershengorn MC 2014 A modified ELISA accurately measures secretion of high molecular weight hyaluronan (HA) by Graves' disease orbital cells. *Endocrinology* **155**:627-634.
113. Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K 2002 Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3609-3614.
114. Marutsuka K, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Sobel BE, Fujii S 1998 Pathogenetic implications of hyaluronan-induced modification of vascular smooth muscle cell fibrinolysis in diabetes. *Coron Artery Dis* **9**:177-184.
115. Devaraj S, Yun JM, Adamson G, Galvez J, Jialal I 2009 C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* **84**:479-484.
116. Park D, Kim Y, Kim H, Kim K, Lee YS, Choe J, Hahn JH, Lee H, Jeon J, Choi C, Kim YM, Jeoung D 2012 Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGFβ receptor interaction via CD44-PKCδ. *Mol Cells* **33**:563-574.
117. Mueller AM, Yoon BH, Sadiq SA 2014 Inhibition of hyaluronan synthesis protects against central nervous system (CNS) autoimmunity and increases CXCL12 expression in the inflamed CNS. *J Biol Chem* **289**:22888-22899.
118. Yoshioka Y, Kozawa E, Urakawa H, Arai E, Futamura N, Zhuo L, Kimata K, Ishiguro N, Nishida Y 2013 Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **65**:1160-1170.
119. Pályi-Krek Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szöllosi J, Nagy P 2007 Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* **43**:2423-2433.
120. Rilla K, Pasonen-Seppänen S, Rieppo J, Tammi M, Tammi R 2004 The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone prevents keratinocyte activation and epidermal hyperproliferation induced by epidermal growth factor. *J Invest Dermatol* **123**:708-714.
121. Li F, Hao P, Liu G, Wang W, Han R, Jiang Z, Li X 2017 Effects of 4-methylumbelliferone and high molecular weight hyaluronic acid on the inflammation of corneal stromal cells induced by LPS. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **255**:559-566.
122. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M 1997 Hyaluronan synthases. *J Biol Chem* **272**:13997-14000.
123. Zhang L, Grennan-Jones F, Lane C, Rees DA, Dayan CM, Ludgate M 2012 Adipose tissue depot-specific differences in the regulation of hyaluronan production of relevance to Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:653-662.
124. Rilla K, Siiskonen H, Spicer AP, Hyttinen JM, Tammi MI, Tammi RH 2005 Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *J Biol Chem* **280**:31890-31897.
125. Jiang D, Liang J, Noble PW 2011 Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* **91**:221-264.
126. Stern R 2004 Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* **83**:317-325.
127. Arai E, Nishida Y, Wasa J, Urakawa H, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N 2011 Inhibition of hyaluronan retention by 4-methylumbelliferone suppresses osteosarcoma cells in vitro and lung metastasis in vivo. *Br J Cancer* **105**:1839-1849.
128. Urakawa H, Nishida Y, Wasa J, Arai E, Zhuo L, Kimata K, Kozawa E, Futamura N, Ishiguro N 2012 Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo. *Int J Cancer* **130**:454-466.

129. Lokeshwar VB, Lopez LE, Munoz D, Chi A, Shirodkar SP, Lokeshwar SD, Escudero DO, Dhir N, Altman N 2010 Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. *Cancer Res* **70**:2613-2623.
130. Anand V, Khandelwal M, Appunni S, Gupta N, Seth A, Singh P, Mathur S, Sharma A 2019 CD44 splice variant (CD44v3) promotes progression of urothelial carcinoma of bladder through Akt/ERK/STAT3 pathways: novel therapeutic approach. *J Cancer Res Clin Oncol* **145**:2649-2661.
131. Nagy N, Kuipers HF, Marshall PL, Wang E, Kaber G, Bollyky PL 2019 Hyaluronan in immune dysregulation and autoimmune diseases. *Matrix Biol* **78-79**:292-313.
132. Bollyky PL, Evanko SP, Wu RP, Potter-Perigo S, Long SA, Kinsella B, Reijonen H, Guebtner K, Teng B, Chan CK, Braun KR, Gebe JA, Nepom GT, Wight TN 2010 Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol* **7**:211-220.
133. Peyster RG, Ginsberg F, Silber JH, Adler LP 1986 Exophthalmos caused by excessive fat: CT volumetric analysis and differential diagnosis. *AJR Am J Roentgenol* **146**:459-464.
134. Ji E, Jung MY, Park JH, Kim S, Seo CR, Park KW, Lee EK, Yeom CH, Lee S 2014 Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and suppression of abdominal fat accumulation in high-fat diet-feeding C57BL/6J mice after downregulation of hyaluronic acid. *Int J Obes (Lond)* **38**:1035-1043.
135. Grandoch M, Flögel U, Virtue S, Maier JK, Jelenik T, Kohlmorgen C, Feldmann K, Ostendorf Y, Castañeda TR, Zhou Z, Yamaguchi Y, Nascimento EBM, Sunkari VG, Goy C, Kinzig M, Sörgel F, Bollyky PL, Schrauwen P, Al-Hasani H, Roden M, Keipert S, Vidal-Puig A, Jastroch M, Haendeler J, Fischer JW 2019 4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Nat Metab* **1**:546-559.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/204/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Galgóczi Erika
Neptun kód: IUM6ZH
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Galgóczi, E.**, Jeney, F., Katkó, M., Erdei, A., Gazdag, A., Sira, L., Bodor, M., Berta, E., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Győry, F., Nagy, E. V.: Characteristics of Hyaluronan Synthesis Inhibition by 4-Methylumbelliferone in Orbital Fibroblasts.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 61 (2), 27-, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iops.61.2.27>
IF: 3.812 (2018)
2. **Galgóczi, E.**, Jeney, F., Gazdag, A., Erdei, A., Katkó, M., M. Nagy, D., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Győry, F., Berta, E., Nagy, E. V.: Cell density dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF-[béta] in orbital fibroblasts.
J. Endocrinol. 229 (2), 187-196, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0524>
IF: 4.706





További közlemények

3. Sumanszki, C., Kiss, E., Simon, E., **Galgóczi, E.**, Soós, Á., Patócs, A., Kovács, B., Nagy, E. V., Reismann, P.: The Association of Therapy Adherence and Thyroid Function in Adult Patients with Phenylketonuria.
Ann. Nutr. Metab. 75 (1), 16-23, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000501301>
IF: 3.051 (2018)
4. Frendl, I., Katkó, M., **Galgóczi, E.**, Boda, J., Zsíros, N., Németi, Z., Bereczky, Z., Hudák, R., Kappelmayer, J., Erdei, A., Turchányi, B., Nagy, E. V.: Plasminogen Activator Inhibitor Type 1: a Possible Novel Biomarker of Late Pituitary Dysfunction after Mild Traumatic Brain Injury.
J. Neurotrauma. 34 (23), 3238-3244, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5198>
IF: 5.002

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,571

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,518**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.06.23.



11. Tárgyszavak

endocrin orbitopathia, orbita fibroblastok, PAI-1, hialuronan, sejt denzitás, TGF- β , 4-metilumbelliferon, hialuronan szintáz, hialuronidáz

12. Keywords

endocrin orbitopathy, orbital fibroblasts, PAI-1, hyaluronan, cell density, TGF- β , 4-methylumbelliferone, hyaluronan synthase, hyaluronidase

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Nagy V. Endre** professzornak, hogy munkámat az elmúlt években irányította, és azt is, hogy az általa vezetett endokrin kutatócsoportban dolgozhatok.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Prof. Dr. Paragh Györgynek**, a Belgyógyászati Intézet korábbi, és **Prof. Dr. Balla Józsefnek**, a Belgyógyászati Intézet jelenlegi igazgatójának, amiért lehetővé tették, hogy az Intézetben végezhettem a kutatómunkámat.

Ugyancsak köszönettel tartozom **Dr. Jeney Florencenek**, aki értékes szakmai és baráti jellegű tanácsokkal látott el, amelyek nagyban hozzájárultak a tudományos tevékenységem sikerességéhez.

Hálával tartozom **Dr. Katkó Mónikának** a mérések során és a tudományos publikációk előkészítésében nyújtott értékes mindennapi segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Steiber Zitának**, **Dr. Ujhelyi Bernadettnek** és **Dr. Győry Ferencnek**, akik kutatásomhoz biztosították a sejtvonalak létrehozásának alapjául szolgáló szövetmintákat.

Ugyancsak köszönetemet szeretném kifejezni a Belgyógyászati Intézet **Endokrinológia-Anyagszere Kutatólaboratórium munkatársainak** a zavartalan munkavégzést biztosító légkör megteremtéséért, és az **Endokrinológia Tanszék valamennyi munkatársának**, ahol a csapat tagjaként szembesültem a transzlációs kutatás fontosságával.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, nővéremnek, férjemnek, hogy az évek során támogattak és kiegyensúlyozott családi háttérrel biztosítottak munkámhoz.

Vizsgálatainkat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (OTKA K105733) támogatta. Készült a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031 „A legnagyobb súlyú

népbetegségek genetikai meghatározottsága a magyar populációban” és a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 „A magyar gazdaság versenyképességének növelése a lakosság egészségi állapotát javító népegészségügyi intervenciók célcsoportjainak és tartalmának azonosítása révén” című projekt támogatásával.

14. Függelék

Értekezés alapjául szolgáló közlemények.