

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az orbita fibroblasztok hialuronsav termelésére ható
tényezők vizsgálata endocrin orbitopathiában**

Papp Fruzsina Réka

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Az orbita fibroblasztok hialuronsav termelésére ható tényezők vizsgálata endocrin orbitopathiában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Egészségtudományok tudományágban

Írta: Papp Fruzsina Réka okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Anyagcsere és Endokrin betegségek megelőzése és kontrollja programja)
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nagy Péter, MTA doktora
Dr. Csajbók Éva, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy Péter, MTA doktora
Prof. Dr. Módis László, MTA doktora
Dr. Csajbók Éva, PhD
Dr. Katona Evelin, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. április 17. 13:00

Bevezetés

Az endocrin orbitopathia (EOP) az orbita komponenseit – elsősorban a kötőszövetet és a külső szemizmokat – érintő autoimmun gyulladás. Fő klinikai jellemzői a szemizmok megvastagodása és ödémássá válása mellett az orbita szövetek térfogat-növekedése miatt fellépő szemtünetek. Az autoimmun folyamat elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblasztok. Az orbita és pajzsmirigy autoimmunitás közötti pathogenetikai kapcsolat a pajzsmirigy stimuláló hormon receptor (TSHR) ellenes autoantitestek (TRAb) jelenlétének tulajdonítható, hiszen a TSHR a pajzsmirigy folliculáris sejtjein és az orbitában található fibroblasztok felszínén egyaránt expresszálódik. A receptor autoantitestekkel történő stimulációja olyan jelátviteli folyamatokat indít el, melyek következtében a fibroblaszt sejtek proliferációja és gyulladásos citokin termelése fokozódik, míg az orbitát infiltráló immunsejtek által termelt faktorok a gyulladásos állapot fenntartása mellett további fibroblaszt aktivációt váltanak ki.

Az aktivált orbita fibroblasztok (OF) miofibroblaszt irányú differenciálódáson mehetnek keresztül, melynek során amellet, hogy az aktin citoszkeleton átrendeződése révén kontraktilisebbé válnak, az extracelluláris mátrix (ECM) termelésük is megváltozik. A fibroblasztokat körülvevő ECM egyik fő komponense a hialuronsav (HA), melyről ismert, hogy nagy vízmegkötő képessége révén hozzájárul az ödéma kialakulásához, jelentősen súlyosbítva ezzel az orbitában zajló folyamatot.

A transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) a miofibroblaszt fenotípus irányába történő differenciálódás kulcsfontosságú regulátora és egyben az ECM átrendeződés egyik ismert szabályozója is. A TGF- β által indukált miofibroblaszt differenciálódás HA anyagcserére gyakorolt hatása és annak szerepe az EOP lefolyásában még nem tisztázott.

A betegség hátterében álló autoimmun gyulladás kezelése céljából a glükokortikoidokat (GC) évtizedek óta alkalmazzák első vonalbeli szerként. Így fontosnak tartottuk annak megismerését is, hogy ezek a gyógyszerek milyen hatást gyakorolnak a különböző eredetű fibroblasztok proliferációjára és HA anyagcseréjére.

Irodalmi áttekintés

Az endocrin orbitopathia epidemiológiája

Az EOP az orbita komponenseinek autoimmun gyulladása. Az esetek körülbelül 90%-ában hyperthyreosishoz társultan alakul ki, de euthyreoid állapotban vagy hypothyreoid autoimmun thyreoiditis kíséretében is megjelenhet. Graves-Basedow kórban szenvedő betegek 20-30%-ánál extrathyreoidális szövődményként jelentkezik. Az EOP nőknél gyakrabban alakul ki, ám a férfiaknál súlyosabb lefolyású lehet. Éves incidenciája nők esetén 16/100 000, férfiaknál 2,9/100 000 míg prevalenciája 0,25%. A nők esetén 40-44 és 60-64 év között, férfiaknál 45-49 és 65-69 év közötti életkorban fordul elő leggyakrabban. Az EOP kialakulását különböző környezeti tényezők is befolyásolják, mint például a dohányzás, a bél mikrobiom változása, magas szérumszintű koleszterin, a D-vitamin- és szelénhiány. Ezek között kiemelt szerepet játszik a dohányzás, amely közel nyolcszorosára növeli az EOP kockázatát. Ezen kívül genetikai tényezők, így a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor gamma (PPAR γ), a plazminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) és TSHR génjeit érintő polimorfizmusok is hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához.

Az endocrin orbitopathia klinikai képe, stádiumbeosztása és diagnosztikája

Az EOP tünetei változatosak lehetnek. Az egyik leggyakrabban előforduló panasz a retrobulbaris nyomó fájdalom, emellé azonban számos egyéb tünet is társulhat, mint az exophthalmus, kettőslátás, a szemhéjak retrakciója, a szemhéj és kötőhártya vörössége és duzzanata, valamint az expozíciós keratopathia vagy szaruhártyafekély. Súlyos esetekben dysthyroid opticus neuropátia (DON) is kialakulhat. Jóllehet látásvesztéssel fenyegető EOP csupán 3-5%-ban fordul elő, a betegség már enyhébb lefolyás esetén is jelentősen rontja a betegek életminőségét.

Az European Group of Graves Orbitopathy (EUGOGO) kritériumrendszere a betegeket súlyosság szerinti alcsoportokba sorolja. Enyhe EOP esetén a betegek életminőségét az EOP csekély mértékben befolyásolja, és nem indokolt az immunszuppresszió vagy műtéti kezelés. Az alábbiak közül, esetükben általában egy vagy több tünet jelentkezik: 2 mm-nél kisebb felső szemhéj retrakció, enyhe szemhéj és/vagy kötőhártya érintettség, a populációs átlagot legfeljebb 2 mm-rel meghaladó exophthalmus. Kettőslátás nem alakul ki, vagy csak naponta néhány órán át jelentkezik, és a szaruhártya érintettség lokális eljárásokkal,

szemcseppel, szemkenőccsel kezelhető. Közepesen súlyos és súlyos EOP esetén nem áll ugyan fenn látáskárosodás veszélye, viszont a betegség olyan mértékben befolyásolja a betegek életminőségét, hogy a szükséges kezelés (immunszuppresszió, szemészeti műtét) kockázata vállalható. Ebben a súlyossági csoportban a 2 mm-nél nagyobb felső szemhéj retrakció, közepes vagy súlyos szemhéj és/vagy kötőhártya érintettség, populációs átlagot legalább 3 mm-rel meghaladó exophthalmus és átmeneti vagy tartós kettőslátás közül legalább egy jelen van. Látásvesztéssel fenyegető, súlyos EOP esetén opticus neuropathia vagy szaruhártyafekély áll fenn.

A betegek vizsgálatakor az orbiták állapota az ATA (Amerikai Pajzsmirigy Társaság) klasszifikációja szerint jellemezhető, mely a betegség súlyosságát tükrözi, és lehetőséget ad a változások követésére. Az orbita komponensek és a szemizmok érintettségének megítéléséhez legalább egyszer szükséges MR-vizsgálat elvégzése. Az immunfolyamat aktivitása MR módszerrel - az izmok T2 relaxációs ideje és a zsírelnyomások STIR felvételek alapján - továbbá a szomatosztatin-analóggal vagy dietilén-triamin-pentaecetsavval (DTPA) végzett SPECT segítségével és a klinikai aktivitási pontszám (CAS) alapján értékelhető.

Az endocrin orbitopathia kezelése

Az EOP kezelése jelenleg két hasonló tartalmú nemzetközi ajánlás, az European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) és az ennél újabb, az európai és az amerikai pajzsmirigy társaság közös ajánlása alapján történik.

Enyhébb esetekben szelén rendszeres szedése kedvező hatást gyakorolhat a betegség lefolyására. Emellett kiemelten fontos a dohányzás abbahagyása, hiszen az nemcsak az EOP kialakulásának kockázatát és a súlyosabb formák megjelenését fokozza, hanem jelentősen csökkenti a kezelés hatékonyságát is. Lokális szemészeti készítmények, műkönyv, és a cornea kiszáradását gátló szemzselé segítik a cornea védelmét. A prosztaglandin-analóg tartalmú szemcseppek csökkenthetik a megnövekedett szemnyomást.

Kezelés során a pajzsmirigyműködést az euthyreoid tartományba kell beállítani; a hyperthyreosis és a kezelés során esetleg kialakuló átmeneti, iatrogen hypothyreosis is kedvezőtlen a betegség szempontjából. A pajzsmirigy túlműködés kezelésére pajzsmirigy műtét is választható, különösen középsúlyos vagy súlyos EOP és magas TRAb szint esetén. A hyperthyreosis műtéti kezelése után – mely EOP-ban near total vagy total thyreoidectomia – korai thyroxin-pótlás szükséges. A pajzsmirigy eltávolítás önmagában is javulást eredményezhet az EOP lefolyásában, feltehetően az orbitában és a pajzsmirigyben is jelen levő TSHR mint autoantigén mennyiségének csökkentése révén. A hyperthyreosis radioaktív

jód izotóppal történő kezelése kontraindikált aktív, középsúlyos és súlyos EOP esetében. A radiojód a betegek körülbelül egyharmadánál a már meglévő szemtünetek súlyosbodásához vezet, és a magas kockázatú csoportokban akár EOP-ot is kiválthat. Az EOP inaktív fázisában végzett radiojód kezelés esetén preventív orális kortikoszteroid kezelés ajánlott az orbitát értintő kedvezőtlen hatások megelőzésére.

Középsúlyos és súlyos, immunológiailag aktív EOP-ban immunszuppresszív kezelés szükséges. Az elsővonalbeli terápia intravénás kortikoszteroidok alkalmazása. A kezelési séma 4,5 g kumulatív dózisú metilprednizolon intravénásan (hetente egyszer 500 mg hat héten át, majd ugyanennyi ideig hetente egyszer 250 mg). Az immunszuppresszív kezelés szempontjából rendkívül fontos a korai felismerés és a betegség aktivitásának felmérése, mert ez a kezelés az immunfolyamat aktivitásának maximumán a leghatásosabb, amely akár hetekkel vagy hónapokkal megelőzheti az EOP súlyos szemtüneteinek kialakulását.

Ha a kortikoszteroid kezelés nem elegendő vagy ellenjavallt, irradiáció (orbitánként 20 Gy kumulatív dózis, 10 alkalommal 2 Gy adása mindkét orbitára) is alkalmazható. Egyes kutatások szerint az intravénás kortikoszteroidok retrobulbáris irradiációval való kombinációja hatékonyabb.

Súlyos, látást veszélyeztető EOP, a nervus opticus kompressziója esetén rövid ideig alkalmazott nagy dózisú intravénás kortikoszteroid kezelés szükséges. Amennyiben két héten belül nem tapasztalható javulás, vagy a terápia ellenére a visus tovább romlik, sürgősségi orbita dekompressziós műtét elvégzése indokolt, amely az orbita lateralis, medialis vagy mindkét csontos falának eltávolításával történik.

Az endocrin orbitopathia pathogenezise

Az orbita fibroblasztok aktivációja

Az EOP pathogenezisében az autoimmun folyamat elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblasztok. A pajzsmirigy és az orbiták ellen irányuló autoimmunitás közötti patogenetikai kapcsolatot felelős autoantigén a TSHR, amely a pajzsmirigy follikuláris sejtein és az orbita fibroblasztokon egyaránt expresszálódik. Az antigén-prezentáló sejtek internalizálják és lebontják a TSHR-t, majd peptidjeit MHCII kapcsolaton prezentálják a helper T-sejtek számára, melyek ezután a CD154–CD40 kapcsolaton keresztül aktiválják az autoreaktív B-sejteket, serkentve a TRAb termelését, vagy autoreaktív T-sejtekként kemotaktikus faktorok hatására eljuthatnak az orbita szövetekbe, ahol a CD40 ligandjukon

(CD154) keresztül kölcsönhatásba lépnek a fibroblasztok felszínén expresszálandó CD40 fehérjével. E folyamatok együttesen a fibroblasztok aktivációját idézik elő.

A plazmasejtek által termelt TRAb szintje kritikus tényező az EOP pathogeneziése szempontjából, mivel a betegség súlyossága szoros korrelációt mutat a TRAb antitesttiterrel. Az inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor (IGF1R) képes fizikai és funkcionális komplexet alkotni a TSHR-ral, és e két receptor együttes aktiválása fokozza az OF sejtek proliferációját. A TSHR autoantitestekkel való stimulálása a PKA/CREB, mTOR, AKT és nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) jelátviteli útvonalak révén fokozza az orbita fibroblasztok proliferációját és gyulladós mediátorok, például interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) termelését. Az IGF1R egy receptor tirozin kináz, amely aktiválja a PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK és IRS jelátviteli utakat. A IGF1R/TSHR jelátvitel a glükózaminoglikánok termelését is serkenti.

Az orbitát infiltráló immunsejtek (CD4⁺ és CD8⁺ T-limfociták, monocyták, makrofágok, B-limfociták, plazmasejtek és hízósejtek) által létrehozott citokin-környezet szintén hozzájárul a fibroblasztok aktiválásához és a gyulladás fenntartásához. Az immunsejtek és fibroblasztok által termelt IL-6 aktiválja a JAK/STAT3 és PI3K/AKT jelátviteli útvonalakat, serkentve a sejtek proliferációját és gyulladós citokin termelését. Az aktivált makrofágok által termelt interleukin-1 β (IL-1 β) fokozza a fibroblasztok proliferációját és hialuronsav termelését a JNK, p38 és AP-1 útvonalakon keresztül. A dendritikus sejtektől, monocitáktól és makrofágoktól származó interleukin-15 (IL-15), támogatja a B- és T-limfociták aktiválódását, míg az interleukin-17 (IL-17) a Th17 sejtek által szekretált gyulladós citokin mely azáltal, hogy kemokinek termelését váltja ki, elősegíti az immunsejtek infiltrációját az orbitába.

A T-limfociták, makrofágok és aktivált hízósejtek által termelt 15d-prostaglandin (PG) J₂, PGE₂ és PGD₂ szintén hozzájárul a szövetek térfogatnövekedéséhez az adipogenezis, gyulladós citokin termelés és ECM termelés fokozásával.

A tumor nekrosis faktor α (TNF α) kulcsfontosságú proinflammatorikus citokin, amely gyulladós molekulák, köztük más citokinek és sejtadhéziós molekulák (ICAM, VCAM) expresszióját váltja ki, valamint fontos szerepet játszik a gyulladós állapot fenntartása és az immunsejtek toborzása mellett a sejtproliferáció, differenciáció és apoptózis szabályozásában. A TNF- α serkenti a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim aktivitását, így elősegíti a prostaglandinok termelését. A TNF- α kötődése a sejt felszíni receptoraihoz (TNFR1 és TNFR2) aktiválja a NF- κ B jelátviteli útvonalat, amely szerepet játszik a gyulladós

mediátorok, például az interleukin-8 (IL-8), monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és vérlemezke-eredetű növekedési faktor BB (PDGF-BB) expressziójának szabályozásában.

Az orbita fibroblasztok maguk is aktívan részt vesznek az autoimmun gyulladás fenntartásában. CD40 expressziójuk révén képesek interakcióba lépni a CD4⁺ T sejtek CD154 ligandjával mely kölcsönhatás eredményeképpen fokozódik a proliferációjuk és gyulladáscitokin (IL-1 és IL-6) termelésük. Az autoreaktív T limfociták által termelt interferon- γ (IFN- γ) fokozza a HA és PG E2 szintézisét, míg az IL-2 a sejtmediált immunválaszban játszik fontos szerepet.

Az orbita fibroblasztokat CD90 glikoprotein expressziója alapján Thy1⁻ (másképpen CD90.) és Thy1⁺ altípusra oszthatjuk. A Thy1⁻ fibroblasztok, azaz preadipociták, képesek adipocita irányába differenciálódni. Emellett magas PPAR γ expresszióval rendelkeznek, ami fokozza az adipogenezist és gátolja az autoimmun gyulladás fenntartását. Ezzel szemben a Thy1⁺ fibroblasztok TGF- β hatására miofibroblasztokká alakulnak. EOP-ban, az orbita fibroblasztok fokozott proliferációja, ECM termelése és adipocitává vagy miofibroblasztokká való differenciálódása a szövetek átrendeződését és egyben térfogatnövekedését okozza.

A miofibroblaszt irányú differenciálódás

A miofibroblasztok kontraktilis, α -simaizom aktin (α -SMA) pozitív sejtek, amelyek szerepet játszanak a sebgyógyulás folyamatában, de tartós jelenlétük és aktivációjuk fibrózist okozhat. A miofibroblasztokat eredetük szerint csontvelői eredetű és nem csontvelői eredetű sejtekre oszthatjuk. A csontvelői eredetűek keringő mesenchymalis őssejtekből vagy CD34⁺ fibrocytákból származnak, míg a nem csontvelői eredetűek fibroblasztokból, epithel, endothel, simaizom és zsírszövetekből, pericytákból vagy daganatos hámsejtekből képződhetnek.

Ahhoz, hogy a fibroblaszt sejtek miofibroblasztá differenciálódjanak, lokálisan három fő kritériumnak kell teljesülnie: (i) biológiailag aktív TGF- β 1 jelenléte, (ii) extracelluláris stressz, amely az ECM mechanikai tulajdonságainak változásából és az extra domén A fibronectin (EDA-FN)/integrin kölcsönhatásokból ered, és (iii) bizonyos fenotípus modulátorok pl. EDA-FN és HA termelődése. Azt az átmeneti állapotot, amikor az aktivált fibroblasztok proliferációja, migrációja, ECM termelése és citokin termelése fokozódik, de α -SMA pozitivitás még nem figyelhető meg proto-miofibroblaszt állapotnak nevezzük

Annak ellenére, hogy a szakirodalomban kevés információ áll rendelkezésre az ezen állapotban lévő sejtek azonosításával kapcsolatban, a proto-miofibroblasztoknak már több kulcsfontosságú jellemzőjét leírták. Ezek egyike az aktin citoskeleton átrendeződése, melynek során a főként membránhoz kötött G-aktin monomer polimerizálódik és

citoplazmatikus F-aktin stresszfilamentumokká alakul. Az F-aktin stresszrostok képződése lehetővé teszi a környező sejtekhez és az ECM komponensekhez való kapcsolódást, kadherin alapú adhézió, valamint integrin-tartalmú membránkomplexek segítségével. A kadherineknél kalciumion-függő sejt felszíni adhéziós molekulák, amelyek a catenin család fehérjéi által kapcsolódnak az aktin citoszkeletonhoz. Az integrinek transzmembrán receptorok, amelyek különböző ECM komponensekhez kapcsolódnak, például az $\alpha 5\beta 1$ integrin a fibronectinhez, míg az $\alpha 2\beta 1$ integrin a kollagénhez.

Az érett miofibroblasztok megjelenését az α -SMA-pozitív stresszrostok képződése igazolja. Emellett az érett miofibroblasztok nagyobb kontraktilitással, valamint emelkedett fibronectin és kollagén expresszióval rendelkeznek.

A miofibroblaszt fenotípus kialakulását három fő jelátviteli útvonal befolyásolja: a TGF- $\beta 1$ /Smad, a HA/CD44/EGFR és a Wnt/ β -catenin útvonal.

A TGF- $\beta 1$ /Smad útvonalon a TGF- $\beta 1$ a LAP komplexből felszabadulva kötődik a TGF β RII dimerekhez, lehetővé téve a TGF β RI-el való kapcsolódását és az útvonal aktiválódását. Ezt követően a Smad2 és Smad3 foszforilálódik, majd a Smad4-el komplexet képezve a sejtmagba transzlokálódik, ahol specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődve szabályozza a pro-fibrotikus gének transzkripcióját.

A HA/CD44/EGFR jelátvitel során, a HA a transzmembrán receptor CD44-hez kötődik, majd a CD44 ko-receptorként működve, az epidermalis növekedési faktor receptor (EGFR) lipid raftokba való transzlokációját idézi elő, aktiválva az EGFR-t, bifázikus jelátviteli folyamatokat indítva el az extracelluláris jel által szabályozott kináz 1/2 (ERK1/2) és kalmodulin-függő protein-kináz II (CaMKII) útvonalakon. A korai folyamatok a differenciációval kapcsolatos gének kifejeződését, míg a késői események a proliferációt szabályozó gének expresszióját serkentik. A TGF- $\beta 1$ fokozza a HA szintézist, ezzel is befolyásolva a HA/CD44/EGFR jelátvitelt.

A Wnt ligand Dickkopf-related protein 1 (DKK1) hiányában egyidejűleg kötődik a Frizzled (FZD) receptor extracelluláris doménjéhez és a kis sűrűségű lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje 5 és -6 (LRP5 és LRP6) koreceptorhoz. Amikor a Wnt ligand megkötődik, a FZD receptor és az LRP5/6 koreceptor komplexet alkotnak. A Wnt ligand közvetett módon foszforilálja az LRP5/6-ot azáltal, hogy olyan jelátviteli folyamatot indít el, amely aktiválja a Disheveled (DVL) fehérjét, valamint toborozza és aktiválja a kreatin-kináz (CK1 γ) és glikogén-szintáz kináz-3 β (GSK-3 β) kinázokat. A Wnt/FZD/LRP jelátviteli útvonal a DVL által közvetített β -catenin gátló komplex gátlásával elősegíti a β -catenin felhalmozódását és annak transzlokációját a sejtmagba, ahol pro-fibrotikus gének expresszióját indukálja.

Kimutatták, hogy a TGF- β 1 a DKK1 gátlásán keresztül képes aktiválni a Wnt jelátviteli útvonalat, ezzel is elősegítve a miofibroblaszt-differenciálódást.

A TGF- β jelátvitel miofibroblaszt differenciálódásban betöltött szerepe

A TGF- β egy 25 kDa-os polipeptid homodimer, amely fontos szerepet játszik a sejtproliferáció, differenciálódás, motilitás, apoptózis és ECM termelés szabályozásában. Három fő isoformája ismert (TGF- β 1, TGF- β 2 és TGF- β 3), melyek közül a TGF- β 1 domináns isoforma.

A TGF- β prekursor formában keletkezik, amely a homodimer mellett egy pro-peptidet is tartalmaz. Szintézis után a TGF- β homodimer a LAP-al (Latency Associated Peptide) interakcióba lépve létrehozza a kis látens komplexet (SLC), amely a sejt belsejében marad a nagy látens komplex (Large Latent Complex, LLC) létrejöttéig, melynek során a látens TGF- β - kötő fehérje (Latent TGF- β -Binding Protein, LTBP) hozzá kapcsolódik, majd a komplex transzlokálódik az extracelluláris térbe. A TGF- β aktiválása enzimek és mechanikai hatások révén történik, például proteázok által, vagy savas környezet hatására, ami denaturálja a LAP-ot. A thrombospondin-1 (TSP-1) és α V integrinek is képesek közvetlenül aktiválni a latens TGF- β -t. A komplexből felszabadult TGF- β ligandok a TGF- β RII-hez kötődnek, mely ezt követően a TGF- β RI-hez kapcsolódik, így hozva létre a funkcionális receptort, míg a TGF- β RIII, más néven bétaglikán koreceptorként funkcionál, mely képes nagy affinitással kötni a TGF- β izoformákat és prezentálni azokat a TGF- β RII számára. A fibroblaszt sejtek miofibroblaszt irányba történő differenciálódásában a TGF- β SMAD-függő útvonala játszik kulcsszerepet. A TGF- β receptor aktiválását követően, a receptor által katalizált foszforilációs folyamat következik, melynek során az R-SMAD-ok (receptor által aktivált SMAD fehérjék), a SMAD2 és SMAD3 foszforilálódnak, majd az R-SMAD-ok oligomert képezzenek a SMAD4 (Co-SMAD) fehérjével.

A SMAD-komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol a célgének promóter régiójában található specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődve szabályozza a pro-fibrotikus gének, így a kollagén, a fibronektin és az α -SMA transzkripcióját. Az I-SMAD-ok, mint a SMAD7, gátolják a R-SMAD-ok és az aktív receptor közötti kölcsönhatást, csökkenteni a receptorok mennyiségét a sejtfelszínen, illetve transzkripciós represszorként is működhetnek a sejtmagban.

A hialuronsav szerepe az endocrin orbitopathia pathogenezisében

Az EOP pathogenezisében kiemelt szerepet játszik az orbita fibroblasztok miofibroblasztá történő differenciálódása, valamint a miofibroblasztok fokozott ECM termelése. A HA, egy szulfátcsoportot nem tartalmazó, lineáris glükózaminoglikán, az ECM egyik fő komponense. Túltermelődése, nagy vízmegkötő képessége miatt jelentősen hozzájárul a szöveti ödéma kialakulásához, negatívan befolyásolva a betegség lefolyását.

A HA bioszintézisét három transzmembrán glikoziltranszferáz izoenzim, a HA szintáz (HAS) 1, 2 és 3 végzi, amelyek UDP-glükuronsavból és UDP-N-acetil-glükózaminból építik fel a HA láncot. E két cukor-nukleotid mennyisége szabályozza a szintázok génexpresszióját. A HAS1 széles mérettartományban (2×10^5 - 2×10^6 Da) hoz létre HA láncokat, míg a HAS2 nagyobb polimereket ($> 2 \times 10^6$ Da), a HAS3 pedig rövidebb láncokat ($< 3 \times 10^5$ Da) szintetizál. A HA láncok, szintézist követően, a szintázokon keresztül sejtfelszínhez horgonyozva vagy sejtfelszíni receptorhoz kötve a pericelluláris térben maradnak, míg fel nem szabadulnak a kötésből.

A lebontást végző hialuronidázok hat alcsaládba sorolhatók. Emlősökben a lizoszómákban található HYAL1 és a plazmamembránhoz kapcsolódó HYAL2 felelős a HA lebontásáért. A HYAL2 a hosszú láncú HA-t kisebb, 10-20 kDa-os oligoszacharidokra bontja. Ezek a HA egységek a sejtfelszíni HA receptorokhoz kötődve endocitózissal jutnak be a sejtbe, ahol a HYAL1 tovább bontja őket. A közelmúltban két új fehérjét is azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a HA lebontásában: a sejt-migrációt indukáló fehérjét (CEMIP/KIAA1199) és a transzmembrán protein-2-t (TMEM2). A CEMIP klatrin-mediált endocitózis révén segíti a hialuronsav depolimerizációját, míg a TMEM2 a CEMIP gátlásán keresztül szabályozza a HA lebontását.

A HA nem csupán szerkezeti elemként funkcionál, hanem az ECM egyéb molekuláival, továbbá autokrin módon ugyanazon a sejtfelszínen lévő HA receptorokkal, míg parakrin módon a szomszédos sejtek HA receptoraival interakcióba lépve sejt-ECM és sejt-sejt közötti kölcsönhatásokban is szerepet játszik.

A HA kötő sejtfelszíni receptorok közül a cluster determinant 44 (CD44) a legjelentősebb, amely a hialuronsavval interakcióba lépve számos élettani és patológiai folyamatban játszik szerepet, például a pericelluláris mátrix retenciójában, a sejt-mátrix szignalizációban, a sejtek migrációjában, valamint a sejtek közötti adhézió kialakításában.

Ezen kívül további receptorok, a hialuronsav által közvetített motilitás receptor (RHAMM), nyirokrendszeri endothelialis hialuronsav receptor (LYEV-1), hialuronsav

endocitózis receptor (HARE) és a toll-like receptor-4 (TLR-4) is képesek kölcsönhatást kialakítani a hialuronsavval. Míg a HA és a HA-kötő fehérjék, mint például az aggregán és a vezikán közötti kölcsönhatások a sejtek közötti kommunikációban és a szövetek mechanikai tulajdonságainak szabályozásában játszanak szerepet.

Célkitűzések

- A TGF- β 1 által indukált miofibroblaszt differenciálódás hatásának vizsgálata a HA anyagcserére, melynek jelentősége az EOP pathogenezisében még nem teljesen tisztázott.
- Annak feltárása, hogy a glükokortikoidok, mint első vonalbeli terápiás szerek, hogyan befolyásolják a különböző eredetű fibroblasztok proliferációját és HA anyagcseréjét, valamint képesek-e visszafogni a PDGF-BB – az EOP korai, aktív szakaszában jelentős szereppel bíró növekedési faktor – proliferációt és HA termelést serkentő hatását.

Módszerek

Primer fibroblaszt kultúrák létrehozása

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemészeti Klinikáján és Sebészeti Klinikáján megjelenő betegek műtéti szövetszövetmintáit használtuk fel. A betegek megfelelő tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (ID: 5913/2012/EKU (84/13)).

Az EOP-ban szenvedő betegek (EOP-OF, n=7) dekompressziós műtete során eltávolított orbita kötőszövetből és nem-EOP betegek (K-OF, n=8) egyéb indikációval végzett – nem pajzsmirigy betegséghez kapcsolódó – szemműtétéből származó kötőszövetmintákból primer orbita fibroblaszt kultúrákat hoztunk létre. A bőrfibroblaszt kultúrákat (BF, n=4) hasi sérvműtét során eltávolított bőrből hoztuk létre.

Az EOP-ban szenvedő betegek esetén a betegség folyamán minden beteg kapott tiroosztatikus gyógyszert, és legalább egy alkalommal 12 hetes intravénás GC kezelésben részesült. A műtéig minden esetben legalább egy év telt el a GC kezelést és az irradiációt követően. Az EOP diagnózisának felállításától eltelt idő mediánja 4 év volt (minimum 1, maximum 9 év). Az EOP betegek a műtét előtti utolsó két hónapban már csak β -blokkolót, diuretikumot, illetve tiroxin pótlást kaptak. A műtét időpontjában a betegek TSH szintje alacsony normál vagy szupprimált volt, míg a pajzsmirigyhormonok szintje referenciaértékeken belül volt. A dekompressziós műtét minden esetben az EOP inaktív fázisában zajlott.

Az orbita- és bőrfibroblaszt kultúrákat Bahn és munkatársai által leírt protokoll alapján hoztuk létre. A sterilen eltávolított szövetszövetmintákat 2x2 mm-es darabokra vágtuk, majd négy alkalommal antibiotikum (penicillin/streptomycin) tartalmú foszfát pufferben (PBS) mostuk, végül az apró szövetdarabokat tenyésztőedénybe helyeztük és 20% (V/V) hőinaktivált magzati borjúszérummal (FBS-sel), stabil glutaminnal és penicillin-streptomycin oldattal kiegészített M199 tápfolyadékban (Biosera, Nuaille, Franciaország) tartottuk fenn őket, 37°C-on, 5 % CO₂ mellett. A tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük. Kettő-négy hét elteltével (a tenyészet proliferációs rátájának függvényében) a szövetdarabokat eltávolítottuk, és a

továbbiakban 10 % FBS, penicillin/streptomycin és stabil-glutamin tartalmú M199 tápfolyadékot használtunk a sejtek fenntartásához.

A konfluencia elérését követően a fibroblasztokat TrypLE Express reagenssel (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kezelve T75-ös flaskába passzáltuk át. Mivel vizsgálatainkat primer sejt kultúrákon végeztük, alacsony, 2-6 közötti passzázs számú tenyészeteket használtunk. A sejtek felszaporítását követően, azokat ismételtén TrypLE Express-el kezeltük, majd centrifugálás után (1000 g) a pelletet fagyasztó keverékben szuszpendáltuk és a kísérletek elvégzéséig folyékony nitrogénben tároltuk.

Kezelések

A kísérletekhez a fibroblasztokat $1,56 \times 10^4$ sejt/cm² sűrűséggel 24- vagy 96-lyukú sejtenyésztő lemezre szélesztettük. A miofibroblaszt irányú differenciálódás HA anyagcserére gyakorolt hatásainak vizsgálata során a kezelésekhez 5 ng/ml TGF- β 1 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmú 10% (V/V) FBS-sel és stabil glutaminnal kiegészített DMEM High Glucose tápfolyadékot használtunk, és a sejteket további 24 illetve 72 órán keresztül inkubáltuk. A glükokortikoidok (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) hatásának vizsgálata érdekében kezelést végeztünk hidrokortizon (HC), prednizolon (P), metilprednizolon (MP), illetve dexametazon (DEX) adásával (0,0001–1,0 μ M tartományban a koncentrációfüggés vizsgálata céljából, majd a továbbiakban 1 μ M koncentrációban, 24 órán át), 10 ng/ml PDGF-BB (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) mellett, valamint annak hiányában 10% (V/V) FBS-sel és stabil glutaminnal kiegészített M199 tápfolyadékban kontroll és EOP orbita fibroblasztokon és bőrfibroblaszt (BF) kultúrákon. Minden kísérletet legalább három alkalommal, legalább három párhuzamos mintán végeztünk el.

Sejtprolifерáció vizsgálat

A sejtek proliferációs rátáját ELISA BrdU (kolorimetriás) kit segítségével mértük. A vizsgálatot a gyártó (Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bazel, Svájc) utasításai szerint végeztük, 96-lyukú plate-ben. A sejt kultúrákhoz a kezelések utolsó 2 órájában 5-bróm-2'-deoxiuridin (BrdU) oldatot adtunk 37°C-on, 5 % CO₂ mellett. A tápfolyadék eltávolítása után a sejteket 30 percig fixáltuk. A fixáló oldat eltávolítását követően, peroxidáz-konjugált anti-BrdU antitestet adtunk a sejtekhez 90 percre, szobahőmérsékleten. Végül hozzá adtuk a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrátot, majd tíz perc inkubálás után 2 N H₂SO₄ oldattal

leállítottuk a reakciót. Ezt követően Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készülékkel mértük az abszorbanciát 450 nm-en (referencia hullámhossz: 620 nm). A mért optikai denzitás (OD) arányos a beépült BrdU mennyiségével, így a sejtproliferáció mértékével is.

Metabolikus aktivitás vizsgálat

Kezelést követően a 96 lyukú plate-be szélesztett sejtekhez 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT) oldatot (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk (0,5 mg/mL végkoncentrációban) és inkubáltuk 4 órán át 37°C-on. A sejtek metabolikus aktivitásukkal arányos mértékben képesek az MTT reagenst, mely egy sárga színű tetrazolium só, formazán származékká alakítani. Ezt követően a felülúszókat óvatosan eltávolítottuk, és a sejtekhez 100 µL/well dimetil-szulfoxidot (DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk, majd spektrofotometriásan elemeztük. A festék abszorbanciáját 595 nm-en mértük, háttérkorrekcióval 660 nm-en, Synergy H1 Microplate Reader (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA) segítségével. Az OD a sejtek metabolikus aktivitását tükrözi, és közvetetten arányos az életképes sejtek számával.

HA koncentráció meghatározás

A 96-lyukú plateken végzett kezeléseket követően a felülúszókat összegyűjtöttük és DuoSet Hyaluronan Kit (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) segítségével, a gyártó által csatolt útmutató alapján meghatároztuk a tápfolyadékba termelt HA mennyiségét. A sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyiségének meghatározásához a sejteket kétszer PBS-el mostuk, majd 0,05 % (w/v) trypsin-EDTA oldattal kezeltük 37°C-on 20 percig. Ezután a reakciót FBS (10% V/V végkoncentráció) hozzáadásával állítottuk le. A sejtszuszpenziót centrifugáltuk (1000 g, 5 perc), és a pericelluláris HA méréshez az így nyert felülúszót használtuk.

Az abszorbanciát mindkét esetben 450 nm-en (referencia hullámhossz: 620 nm) Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral mértük. A HA mennyiségét ng/ml tápfolyadék vagy ng/well értékben fejeztük ki.

Glükozaminoglikán (GAG) izolálás

A felülúszókat összegyűjtöttük és -20°C -on tároltuk a GAG izolálásáig. A fehérje emésztéséhez 1 ml felülúszóhoz 110 μl 1 mg/mL Proteinase K-t (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk 20 mM Tris pufferben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), amely 1% SDS-t tartalmazott, majd 60°C -on 4 órán át inkubáltuk. A GAG kicsapásához 4 ml előhűtött (-20°C) 96%-os etanolt (VWR International, Avantor, Radnor, PA, USA) használtunk, és -20°C -on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a mintákat 14000 g-n 10 percig centrifugáltuk. Az üledéket előhűtött 75%-os etanollal mostuk, majd ismét 14000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A levegőn szárított pelleteket Tris/borát/EDTA (TBE) pufferben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) gyűjtöttük össze, majd 100°C -on 3 percig inkubáltuk, végül hűtőszekrényben tároltuk egy éjszakán át.

Hialuronsav gél-elektroforézis

A HA molekulásúly szerinti elválasztásához Cowman és munkacsoportja által beállított elektroforézis módszert alkalmaztuk. A vizsgálat során standardként különböző ismert molekulatömegű HA (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) vizes oldatait használtunk. Az izolált GAG mintákat és standardokat brómfenolkék tartalmú pufferrel (0,02% brómfenolkék 2 M szacharózzal TBE-ben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) kevertük össze, és 1,5%-os agaróz gélben (Bioline, Meridian Bioscience Inc. Cincinnati, OH, USA) futtattuk TBE pufferben 0,5 órán át állandó 20 V-on, majd 3,5 órán át állandó 40 V-on. Közvetlenül a futtatás után a gélt 1 órán át 30%-os etanolba helyeztük. A gélt egy éjszakán át Stains All (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) festékben festettük. A gélt ezt követően 30 percig 10%-os etanolban inkubáltuk sötétben, majd a szintelenítéshez desztillált vízbe helyeztük. A lila háttér eltávolításához a gélt a munkaasztalon hagytuk. Ezután a gélt beszkeneltük, és a kapott képeket az Image Studio Digit Ver. 5.2 (LI-COR Biotechnology – GmbH, Bad Homburg, Németország) programmal elemeztük.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A 24, illetve 72 órás kezeléseket követően a 24 lyukú plate-en szélesztett sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket 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 (Merck KGaA, Darmstadt,

Németország) adtuk hozzá. A kloroformmal extraháltuk a szuszpenzióban lévő teljes RNS-t. Centrifugáltuk 15 percig 16 000 g-n. A felső vizes fázist új DNáz és RNáz mentes csőbe pipettáztuk az átmeneti fázis érintése nélkül. 375 µl szobahőmérsékletű 100 %-os izopropanolt (VWR International, Avantor, Radnor, PA, USA) adtuk hozzá a vizes fázisban található RNS precipitációjához, majd ismét centrifugáltuk 16 000 g-n 10 percig. Ezután a felülzóró eltávolítása, majd a pellet mosása következett 1 ml hideg 75 %-os etanollal. Befejező lépésként centrifugálást végeztünk 12 000 g-n, 10 percen keresztül. A felülzóró eltávolítása után az izolált RNS-t nukleáz-mentes vízben (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oldottuk, és koncentrációját Synergy H1 Microplate Reader 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, MA, USA) felhasználásával cDNS-sé írtuk át a gyártói leírásában foglaltak szerint.

Végül TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával detektáltuk a vizsgált gének (*ACTA2*, *CEMIP*, *FN*, *GAPDH*, *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*, *HYAL1*, *HYAL2*, *TMEM2*, *COL1A1*) mRNA expresszióját. Az RT-PCR reakciót a CFX Opus 96 Real-time PCR rendszeren (Bio-Rad Hercules, CA, USA) végeztük. A génexpressziós szintek kvantifikálásához a ΔCT módszert használtuk, a célgén expresszióját a GAPDH háztartási gén mRNA szintjéhez viszonyítva normalizáltuk.

Statisztikai elemzés

A vizsgálatok során nyert adatok statisztikai elemzését a Graphpad Prism 10 (GraphPad, Boston, MA, USA) vagy a STATISTICA 14.0 szoftver (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével elemeztük. A kapott eredményeken ismételt mérések varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Tukey vagy Dunnett post hoc teszttel, ahol az alkalmazott kezelés mint belső tényező, a fibroblasztok származási helye (kontroll, EOP és bőr) mint köztes tényező szerepelt.

Az adatokat minden esetben átlag \pm standard hiba (SEM) formájában ábráztuk. A statisztikai próbák eredményét $P < 0,05$ esetben tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A miofibroblaszt differenciálódás hialuronsavsav-anyagcserére gyakorolt hatása

Az alfa-simaizom aktin (α SMA), egyes típusú kollagén alfa lánc (COL1A1), és fibronectin gének expressziójának változásai igazolták, hogy az orbita fibroblaszt sejtek miofibroblaszt irányú transzdifferentiálódáson mentek keresztül, TGF- β stimuláció hatására. Az α SMA és a fibronectin mRNS expressziója kezeletlen OF kultúrák esetén 24 és 72 óra után egyaránt hasonló volt, eredettől függetlenül, míg a kezelés fokozta az α SMA expresszióját mindkét csoportban 24 és 72 óra elteltével ($p < 0,0001$ minden vizsgált esetben). A kezeletlen EOP-OF vonalak COL1A1 expressziója az idő előrehaladtával emelkedett ($p < 0,01$), mely tovább fokozódott TGF- β stimulációt követően mindkét vizsgált időpontban (EOP-OF 24 óra: $p < 0,001$; EOP-OF 72 óra: $p < 0,001$). A K-OF eredetű orbita fibroblasztok COL1A1 expressziója szintén emelkedett az alkalmazott kezelés hatására (K-OF 24 óra: $p < 0,01$; K-OF 72 óra: $p < 0,01$). A kezelt EOP-OF vonalak fibronectin expressziója mindkét időpontban fokozódott (EOP-OF 24 és 72 óra: $p < 0,01$).

A TGF- β kezelés nem befolyásolta a sejtek proliferációját az első 24 órában. Azonban 72 óra elteltével, annak ellenére, hogy az EOP és K-OF kultúrák proliferációja egyaránt csökkent ($p < 0,0001$ mindkét esetben), a TGF- β -val kezelt kultúrák proliferációs rátája magasabb szinten maradt a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva ($p < 0,001$ mindkét esetben). Az orbita fibroblasztok metabolikus aktivitása nem változott a TGF- β kezelés első 24 órájában, azonban 72 óra elteltével mérsékelt növekedés volt megfigyelhető (K-OF 72 óra: $p < 0,001$, EOP-OF 72 óra: $p < 0,01$).

A miofibroblaszt sejteket vizsgálva megfigyeltük, hogy míg a felülúszóba termelt HA mennyisége nem változott a kezeletlen sejtekhez viszonyítva, a pericelluláris HA mennyisége K-OF vonalak esetén 6,1-szeresére ($p < 0,0001$), az EOP OF sejtek 4,7-szeresére ($p < 0,0001$) emelkedett 72 órás TGF- β kezelést követően.

A TGF- β 1 a HAS-1 expresszióra fokozó hatást gyakorolt mindkét vizsgált időpontban ($p < 0,0001$ minden vizsgált esetben), míg a HAS2 és HAS3 mRNS szinteket nem befolyásolta.

A HYAL1 expressziója az idő előrehaladtával emelkedett, azonban ez a növekedés teljes mértékben megszűnt a TGF- β indukált miofibroblaszt irányú transzdifferentiálódás

következtében ($p < 0,0001$). A TGF- β kezelés nem befolyásolta a sejtek HYAL2 mRNS expresszióját.

A hialuronsav katabolizmust a sejt migrációt indukáló fehérje (CEMIP) gátlásán keresztül szabályozó transzmembrán protein 2 (TMEM2) expressziója TGF- β 1 kezelés hatására emelkedett (K-OF 24 óra: $p < 0,001$; EOP-OF 24 óra: $p < 0,01$; K-OF 72 óra: $p < 0,0001$; EOP-OF 72 óra: $p < 0,001$) míg a CEMIP expressziója ezzel párhuzamosan lecsökkent (K-OF 24 óra: $p < 0,001$; EOP-OF 24 óra: $p < 0,01$; K-OF 72 óra: $p < 0,001$; EOP-OF 72 óra: $p < 0,001$).

A felülúszóban megjelenő hialuronsav (HA) frakciók molekulásúly szerinti eloszlását gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a nagy molekulatömegű hialuronsav (HMW-HA) aránya a TGF- β által indukált transzdifferentiálódás következtében fokozódott.

A glükokortikoidok hatása a sejtproliferációra és a hialuronsav-metabolizmusra

Céljaink közé tartozott annak vizsgálata is, hogy az EOP kezelésében használt glükokortikoidok hogyan befolyásolják a különböző eredetű fibroblasztok proliferációs rátáját, hialuronsav termelését, valamint a HA-szintázok és hialuronidázok mRNS-expresszióját önállóan alkalmazva, illetve PDGF-BB stimulációt követően.

Vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy azonosítsuk a hialuronsav-termelést maximálisan gátló legkisebb hatékony glükokortikoid-koncentrációkat $0,0001$ – $1,0 \mu\text{M}$ tartományban. Az K-OF és EOP-OF sejtvonalak alap hialuronsav termelése nem különbözött egymástól. A metilprednizolon és a dexametazon már $0,01 \mu\text{M}$ koncentrációban is jelentősen csökkentette a hialuronsav szekréciót (MP: $p < 0,01$; DEX: $p < 0,001$), míg a prednizolon és a hidrokortizon gátló hatása csak $0,1 \mu\text{M}$ koncentrációnál érvényesült (P: $p < 0,001$; HC: $p < 0,01$). Mivel $1,0 \mu\text{M}$ volt az a koncentráció, amelyenél már minden vizsgált glükokortikoid maximális gátló hatást fejtett ki a hialuronsav szekrécióra (MP: $p < 0,001$; DEX: $p < 0,001$; P: $p < 0,001$; HC: $p < 0,01$), a további kísérleteink során ezt a koncentrációt választottuk.

Az orbita fibroblasztok (K-OF és EOP-OF) és a bőrfibroblasztok (BF) alap hialuronsav szintje nem különbözött, míg az alkalmazott glükokortikoid kezelések mindegyike jelentősen csökkentette a sejtvonalak hialuronsav termelést ($p < 0,01$), eredettől függetlenül.

A fibroblasztok HAS1 expresszióját a sejtek eredete nem befolyásolta. A vizsgált glükokortikoidok közül egyedül a hidrokortizon (1 μ M) volt képes jelentős emelkedést kiváltani az orbita fibroblasztok HAS1 expressziójában ($p = 0,026$). A Metilprednizolon, Dexametazon és Prednizolon kezelések egyik esetben sem befolyásolták a fibroblasztok HAS1 expresszióját. Az alkalmazott kezelések jelentős mértékben csökkentették a HAS2 mRNS szintjét, minden vizsgált fibroblaszt vonal esetén ($p < 0,0001$), kivéve a Hidrokortizont, mely az EOP orbita fibroblasztok esetén nem befolyásolta azt.

A glükokortikoid kezelések mindegyike hatékonyan csökkentette a HAS3 expressziót (HC: $p < 0,0005$, P: $p < 0,0001$, MP: $p < 0,0005$, DEX: $p < 0,0001$). A bőrfibroblasztok (BF) és az orbita fibroblasztok (OF) HAS3 expressziója között nem volt szignifikáns eltérés.

A BF vonalak HYAL1 mRNS expressziója túl alacsonynak bizonyult ahhoz, hogy pontosan meghatározhassuk annak alap- és kezelést követő szintjeit, így azok nem lettek feltüntetve. Orbita fibroblasztok esetén az EOP és K-OF sejtek alap HYAL1 expressziójában nem mutatkozott különbség. A vizsgált glükokortikoidok mindegyike csökkentő hatást gyakorolt az expressziós szintekre az orbita fibroblasztok esetén (HC: $p < 0,0007$, P: $p < 0,0062$, MP: $p < 0,05$, DEX: $p < 0,002$).

Az orbita fibroblasztok (K-OF, EOP-OF), és bőrfibroblasztok (BF) alap HYAL2 expressziója között nem volt eltérés. A különböző eredetű fibroblasztok HYAL2 mRNS szintjét egyik vizsgált glükokortikoid sem befolyásolta.

PDGF-BB kezelés hatására minden sejtvonal hialuronsav termelése fokozódott ($p < 0,0001$). Továbbá a sejtek eredete nem befolyásolta a PDGF-BB kezelésre adott választ. Míg minden glükokortikoid kezelés képes volt a PDGF-BB stimuláló hatása mellett is a sejtek alap HA termelése alá csökkenteni a HA koncentrációt ($p < 0,0001$). A megfigyelt hatás függött a sejtek eredetétől, bőrfibroblasztok esetében volt a legintenzívebb.

Huszonnégy órás PDGF-BB kezelés (10 ng/ml) hatására minden csoportban szignifikánsan emelkedett a sejtvonalak HAS1 expressziója. Azonban orbita fibroblasztok esetén ezt a hatást egyetlen alkalmazott glükokortikoid sem volt képes gátolni. A PDGF-BB kezelés fokozta a HAS2 expressziót EOP és K-OF sejtekben egyaránt. A PDGF-BB által indukált HAS2 expresszió növekedést azonban csak a metilprednizolon ($p < 0,001$) és a dexametazon ($p < 0,002$) voltak képesek csökkenteni. A hidrokortizon és a prednizolon nem befolyásolták azt. Bőrfibroblasztokban (BF) a PDGF-BB HAS2 expresszióra gyakorolt hatása elhanyagolható volt.

A PDGF-BB fokozta a HAS3 mRNS expresszióját orbita fibroblasztokban ($p = 0,049$). A K-OF és EOP-OF sejtvonalak kezelésre adott válasza nem különbözött. A PDGF-

BB által indukált HAS3 expresszió növekedését csupán két vizsgált glükokortikoid, a metilprednizolon ($p = 0,035$) és a dexametazon ($p = 0,029$) volt képes csökkenteni. Míg a PDGF-BB nem befolyásolta a bőrfibroblasztok a HAS3 expresszióit.

PDGF-BB kezelés következtében az EOP-OF ($p < 0,003$) és K-OF sejtvonalak HYAL1 mRNS expressziója egyaránt csökkent. Azonban egyik glükokortikoid sem befolyásolta ezt a hatást. Emellett a PDGF-BB kezelés, sem önállóan, sem pedig glükokortikoidokkal kombinálva, nem befolyásolta a HYAL2 expressziót.

A sejtek proliferációs rátája minden esetben emelkedett PDGF-BB általi stimuláció hatására, eredettől függetlenül ($p < 0,0001$). A PDGF-BB kezelés hatását azonban egyik vizsgált glükokortikoid sem volt képes gátolni az alkalmazott $1 \mu\text{M}$ koncentrációban.

Megbeszélés

Az EOP aktív szakaszában az autoimmun folyamat elsődleges célsejtjei az orbita fibroblasztok. Aktiválódásuk következtében HA termelésük fokozódik, amivel jelentősen hozzájárulnak a tüneteket okozó volumen expansio, ödéma kialakulásához. Az EOP pathogenesisének felderítését célzó *in vitro* kísérletek során gyakran vizsgálják az orbita fibroblasztok HA szintézisét, mégis kevés adat áll rendelkezésre a HA anyagcserében szerepet játszó enzimek expressziójának változásáról a betegség lefolyása során.

A betegség előrehaladtával az aktivált orbita fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciálódáson mehetnek keresztül. A kísérleteink során használt TGF- β multifunkcionális citokin, amely amelllett, hogy ismert a sejtnövekedés, motilitás, mátrix átrendeződés és a pericelluláris proteolitikus aktivitás szabályozásában betöltött szerepe, a miofibroblaszt fenotípus irányába történő differenciálódás indukálásában és a fenotípus fenntartásában is kulcsfontosságú. Korábbi vizsgálatok során jelentős TGF- β expressziót mutattak ki súlyos EOP-ban szenvedő betegek orbita kötőszövetében, amely korrelált a betegek klinikai aktivitási pontszámával, tehát feltételezhetjük, hogy a miofibroblaszt irányú differenciálódás a betegség aktív szakaszában elindul. Az EOP pathogenesis során a miofibroblasztok fontos szerepet játszhatnak az orbita szövetek átrendeződésében, azonban bizonyos tulajdonságaik, beleértve a HA metabolizmusukat, még nem teljesen tisztázottak.

Vizsgálataink során, a miofibroblaszt markerekként használt αSMA , COL1A1 és a fibronectin mRNS expressziójának növekedése alátámasztotta, hogy a transzdifferenciálódás a miofibroblaszt fenotípus irányában valóban bekövetkezett a TGF- β stimuláció hatására orbita fibroblasztokban. Az αSMA fokozódó expressziója felelős a miofibroblasztok

kontraktilis fenotípusáért, és képes a mechanoszenzitív Hippo jelátviteli útvonal modulálására a Yes-asszociált fehérje (YAP) és a PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor (TAZ) aktiválásával, a YAP/TAZ pedig képes szabályozni az α SMA expresszióját. A YAP és TAZ mechanotranszdukciós fehérjék kölcsönhatásba léphetnek a Smad transzkripciós faktorokkal, melyek a TGF- β jelátviteli útvonal klasszikus mediátorai. A TGF- β a SMAD függő, kanonikus jelátviteli útvonal révén fokozza a YAP/TAZ nukleáris transzlokációját és célgénjeik expresszióját a fibroblasztokban. Ezzel szemben a YAP knockdown, vagy hatékony YAP gátlóval végzett kezelés gátolja a TGF- β által indukált Smad2/3 nukleáris transzlokációját és transzkripciós aktivitását, így közvetett módon a fibrotikus markerek, köztük az α SMA expressziója is csökken. A Hippo és a TGF- β jelátviteli útvonalak közötti kapcsolatot orbita fibroblasztokban is igazolták. Bár az α SMA-t gyakran a miofibroblasztok kulcsmarkerének tekintik, a műanyag felületen tenyésztett különböző eredetű mesenchymalis stroma sejtek is rendelkeznek alap α SMA expresszióval, amelyet a TGF- β tovább fokozhat. Ezt a jelenséget K-OF és EOP-OF sejt kultúrák esetén egyaránt megfigyeltük.

Azt tapasztaltuk, hogy 72 óra elteltével az orbita fibroblasztok alap proliferációs rátája csökkent a konfluens kultúrákban, ami a kontakt gátlás, mint negatív regulátor jelenlétére utal. A megfigyelt csökkenés mértéke minden esetben kisebb volt TGF- β kezelt sejtek esetén. Ezzel összhangban a 72 órás TGF- β kezelést követően a sejtek metabolikus aktivitása is növekedett, ami lehet a magasabb proliferációs ráta következménye. A TGF- β hatása különböző sejt típusok proliferációjára változó lehet, a sejtek állapotától és szöveti környezettől függően. A TGF- β gátolhatja a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek proliferációját és a hematopoetikus őssejtekre is hatással van, ahol a sejtek fejlődési állapotától függően serkentheti vagy gátolhatja a proliferációt. A daganatos sejtek proliferációját is befolyásolja: korai szakaszban daganatellenes, míg később pro-onkogén szerepet játszhat, elősegítve a sejtek invázióját és a daganatos szövetek angiogenezisét. Meran és munkatársai eredményei alapján, mely szerint a sejtek HA termelő képessége befolyásolja a TGF- β proliferációra gyakorolt hatását, feltételezzük, hogy az orbita fibroblasztok jelentős HA termelése hozzájárul ahhoz, hogy ebben a sejt típusban a TGF- β emeli a proliferációs rátát.

Kimutattuk, hogy a sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyisége fokozódott a TGF- β kezeléssel indukált miofibroblaszt irányú differenciálódás következtében. A tápfolyadékba termelt HA esetén igazoltuk, hogy nőtt a HMW-HA aránya az összHA koncentráció változása nélkül.

A TGF- β a HAS-1 expresszióra fokozó hatást gyakorolt mindkét vizsgált időpontban, míg a HAS2 és HAS3 tekintetében nem tapasztaltunk emelkedést. Habár kutatócsoportunk korábbi eredményeivel összhangban kimutattuk, hogy orbita fibroblasztokban a HAS2 a domináns szintáz, eredményeink alapján úgy véljük, hogy a miofibroblaszt transzdifferentiálódás során, annak ellenére, hogy alap enzimaktivitása alacsonyabb, mint a többi szintázé, a HAS1 expressziójának fokozódása jelentős szerepet játszik a pericelluláris HA koncentrációjának emelkedésében.

További megfigyelésünk, hogy TGF- β kezelés következtében, a HYAL1 és CEMIP expressziós szintje csökkent, ami szintén hozzájárulhat a pericelluláris HA koncentráció emelkedéséhez és egyúttal magyarázatot adhat a HMW-HA arányának növekedésére, az MMW-HA és LMW-HA mennyiségének csökkenése mellett. Ezzel szemben a TMEM2 expressziója 72 órás TGF- β 1 kezelés hatására jelentősen emelkedett.

Míg korábban, egérm modellen végzett vizsgálatok alapján úgy vélték, hogy a TMEM2 katalitikus hialuronidáz funkcióval rendelkezik, friss irodalmi adatok támasztják alá, hogy a humán TMEM2 (hTMEM2) éppen ellenkezőleg, valójában a HA felhalmozódását segíti elő a CEMIP expressziójának gátlása révén. Ugyan az egér (mTMEM2) és hTMEM2 fehérjeszerkezete nagyfokú homológiát mutat, Sato és munkatársai egér és humán TMEM2 hibrid konstrukciók vizsgálatával igazolták, hogy míg az mTMEM2 hialuronidázként csökkenti a HA felhalmozódását, annak humán megfelelője ellentétes hatást vált ki. Habár az EOP egérm modelljében a TMEM2 expressziójának fokozása csökkentette a gyulladást, valamint az adipogenezis és a fibrózis mértékét, az egér és humán eredetű TMEM2 enzimaktivitásának eltérése miatt, további vizsgálatokra van szükség a hTMEM2 EOP pathogenesisében betöltött szerepének tisztázása érdekében.

Az orbita fibroblasztok, függetlenül attól, hogy EOP vagy nem EOP betegektől származtak, hasonlóan reagálnak a TGF- β kezelésre a HA metabolizmusuk és proliferációs rátájuk és a vizsgált mRNS expressziók tekintetében, illetve egyaránt hasonlóan reagáltak az alkalmazott kezelésekre. A miofibroblaszt markerek közül az α SMA és a COL1A1 hasonló ütemben emelkedtek a sejtek eredetétől függetlenül, míg a TGF- β kezelést követő fibronectin expresszió növekedése csak az EOP-OF kultúrákra volt jellemző.

A kapott eredmények tükrében megállapíthatjuk, hogy miofibroblaszt irányú differentiálódás során, a HAS1 és TMEM2 fokozott expressziója és két specifikus hialuronidáz (HYAL1 és CEMIP) mRNS szintjének csökkenése állhat a pericelluláris HA felhalmozódás és HMW-HA frakció növekedésének hátterében. A pericelluláris térben felhalmozódó HA, nagy vízmegkötő képessége miatt, hozzájárul az orbita szövetek

térfogatnövekedéséhez, illetve ödémássá válásához, és egyúttal fokozhatja a fibroblasztok proliferációját, valamint a leukociták infiltrációját, ezzel rontva az EOP lefolyását.¹⁵² Megfigyeléseink alapján úgy véljük, hogy a hialuronidázok potenciális célpontok lehetnek az EOP kezelésében.

Az EOP kezelése során jelenleg az autoimmun gyulladás csökkentése révén ható terápiát, ezen belül is első vonalbeli szerként glükokortikoidokat alkalmaznak. Ismert, hogy a glükokortikoidok képesek gátolni a T-sejteket aktiváló citokineket és adhéziós molekulákat, valamint csökkenteni az immunsejtek proliferációját és infiltrációját. Igazolást nyert továbbá az is, hogy a glükokortikoidok képesek gátolni a HA termelést többféle sejttípusban, például a hidrokortizon bőrfibroblasztokban, illetve a dexametazon bőr és orbita fibroblasztokban, szinoviocita sejt kultúrákban, valamint az ízületi folyadékból izolált leukocitákban, pajzsmirigysejtekben és pajzsmirigy eredetű fibroblasztokban egyaránt.

Kísérleteink során minden, 24 órán át alkalmazott glükokortikoid kezelés (hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon és dexametazon) jelentősen csökkentette a vizsgált fibroblaszt kultúrák HA termelését, elsősorban a HAS2 és HAS3 expressziójának csökkentése révén.

Kevés adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a glükokortikoidok miként hatnak a hialuronidázok expressziójára. Gebhardt és munkatársai kimutatták, hogy dexametazon (DEX) kezelést követően a bőrfibroblasztok HA termelése csökken, a HYAL1 és HYAL2 mRNS szintje és enzimaktivitása változatlan marad. Mások egér makrofágokban csökkenést találtak a HYAL1 expressziójában dexametazon kezelést követően. Ezeket az eredményeket támasztják alá jelen megfigyeléseink is, miszerint a glükokortikoidok csökkentik a HYAL1 expresszióját. Feltételezésünk szerint, a glükokortikoid kezelést követő csökkent HA termelés elsősorban a HAS2 és HAS3 expressziójában bekövetkező változások következménye, az összefolyamatot a HYAL1 általi HA lebontás mértékének csökkenése valószínűleg kevésbé befolyásolja. Azonban a HA lebontását szabályozó enzimek pontos szerepe, valamint a HA fragmentációjának hatása az EOP patogenezisében továbbra sem teljesen tisztázott.

A PDGF-BB, mely ismert a hialuronsav szintézist serkentő hatásáról, minden vizsgált esetben fokozta a HA termelést és a sejtek proliferációját. Kísérleteink során egyik glükokortikoid kezelés sem befolyásolta az orbita eredetű fibroblasztok proliferációs rátáját, továbbá a PDGF-BB okozta proliferáció fokozódásra sem voltak hatással. Ez alapján feltételezzük, hogy a glükokortikoidok hatásában nem játszik szerepet az orbita fibroblasztok proliferációjának befolyásolása. Munkánk során kimutattuk, hogy minden alkalmazott

glükokortikoid képes volt csökkenteni a fibroblasztok HA termelését önmagában adva és PDGF-BB jelenlétében egyaránt.

A glükokortikoidok többféle módon befolyásolhatják a PDGF-BB stimuláló hatását. Ismert, hogy *in vivo* a glükokortikoidok immunszuppresszív ágensekként működve gátolják a T-sejtek aktivációját és szövetekbe való infiltrációját. Az NF- κ B kulcsfontosságú transzkripciós faktor a gyulladásos mediátorok szintézisében és szabályozásában. Az aktivált glükokortikoid receptor-komplex képes közvetlenül kölcsönhatásba lépni az NF- κ B p65 alegységével, gátolva annak DNS-hez való kötődését, ezáltal blokkolva a gyulladásos gének átírását, így a glükokortikoidok közvetlenül csökkentik a gyulladást és a PDGF-BB expresszióját, ami magyarázatként szolgálhat arra, hogy miként csökkenthetik a glükokortikoidok a PDGF-BB által stimulált HA termelést. Emellett a glükokortikoidok kedvező hatást fejtenek ki a sejtek energiaegyensúlyának fenntartásában kulcsszerepet játszó adenzin-monofoszfát-aktivált protein kináz (AMPK) foszforilációja révén is, hiszen habár a HAS enzimek közvetlenül nem igényelnek ATP-t a működésükhöz, az általuk használt prekursorok szintéziséhez az ATP elengedhetetlen. Az AMPK aktivációja közvetett módon gátolja a HA szintézist azáltal, hogy korlátozza a szükséges prekursorok, az UDP-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNAc) és az UDP-glükuronsav (UDP-GlcUA) hozzáférhetőségét.

Korábbi eredményekkel összhangban megállapítottuk, hogy az orbita fibroblasztok és a bőrfibroblasztok eltérő HAS mRNS expressziós mintázatot mutatnak, de emellett a PDGF-BB kezelésre adott válaszukban is különböznek. A PDGF-BB kezelés EOP és K-OF sejtekben egyaránt fokozta a HAS2 és HAS3 expressziót, míg bőrfibroblasztokban a PDGF-BB HAS2 és HAS3 expresszióra gyakorolt hatása elhanyagolható volt. Az alkalmazott glükokortikoidok jelentős mértékben csökkentették a HAS2 mRNS szintjét, minden vizsgált fibroblasztkulturára esetén, kivéve a hidrokortizont, mely az EOP orbita fibroblasztok HAS2 expresszióját nem befolyásolta. A PDGF-BB által indukált HAS2 expresszió növekedést azonban csak a metilprednizolon és a dexametazon volt képes gátolni. A glükokortikoid kezelések mindegyike hatékonyan csökkentette a HAS3 expressziót. Li és munkatársai megfigyelték, hogy a HYAL1 expressziója 4 órával a PDGF-BB kezelés után megnövekedett, azonban a 24 órás eredményeik már megegyeznek a mi megfigyeléseinkkel: a HYAL1 expresszió csökkent, míg a HYAL2 változatlan maradt.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a glükokortikoidok hatása az EOP kezelésében túlmutat az immunfolyamatok modulálásán. A HA kóros felhalmozódása – mely elsősorban az orbita fibroblaszt aktiváció és a miofibroblaszt irányú differenciálódás következménye – nagyban hozzájárul az ödéma kialakulásához és a jellegzetes szemtünetek megjelenéséhez.

Azáltal, hogy a glükokortikoidok képesek csökkenteni a HA termelést a szintáz enzimek gátlásán keresztül, további kedvező hatást gyakorolhatnak az EOP lefolyására, javítva a betegek életminőségét.

Új megállapítások

1. Az orbita fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciálódása során a sejtek HA turnover csökken, elsősorban egyes hialuronidázok (HYAL1 és CEMIP) expressziójának csökkenése következtében, ami az emelkedő HAS1 expresszióval együtt a sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyiségét növeli, a tápfolyadékba termelt HA esetén pedig a HMW-HA irányába tolja a HA molekulatömeg szerinti megoszlását.
2. Az orbita fibroblasztok HA termelése szerepet játszhat abban, hogy e sejtípus esetén a TGF- β kezelés a proliferáció fokozásával jár.
3. Az EOP kezelése során alkalmazott glükokortikoidok a bőrfibroblasztokban megfigyelthez hasonlóan csökkentik az orbita fibroblasztok HA termelését, még PDGF-BB-vel történt stimulációt követően is, melynek hátterében a HAS2 és HAS3 expresszióra gyakorolt gátló hatásuk áll.
4. A glükokortikoidok nem befolyásolják az orbita fibroblasztok proliferációját, és nem képesek a PDGF-BB proliferációt fokozó hatásának mérséklésére sem.

Összefoglalás

Az endocrin orbitopathia (EOP) patogenezisében az orbita fibroblasztok (OF) miofibroblasztta történő differenciálódása kiemelt szerepet játszik, amelynek kulcsfontosságú regulátora a TGF- β 1. A miofibroblasztokat fokozott extracelluláris mátrix (ECM) termelés jellemzi, melynek egyik fő komponense, a hialuronsav, nagy vízmegkötő képessége miatt, jelentősen hozzájárul a szöveti ödéma kialakulásához, rontva az EOP lefolyását. Vizsgáltuk a miofibroblaszt irányú differenciálódás hatását az orbita fibroblasztok hialuronsav metabolizmusára, valamint az EOP kezelésében használt glükokortikoidok (GC) hatását a fibroblasztok proliferációjára és HA anyagcseréjére.

Igazoltuk, hogy az OF sejtek TGF- β 1 általi stimulációt követően miofibroblaszt irányú transzdifferenciálódáson mentek keresztül. Hetvenkét óra elteltével a kezeletlen tenyészetek proliferációs rátája csökkent; ez kisebb mértékű volt TGF- β 1 kezelt sejtekben. Megfigyeltük, hogy a pericelluláris hialuronsav mennyisége fokozódott, míg a felülúszó hialuronsav tartalma nem változott a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A TGF- β 1 a hialuronsav-szintáz-1 (HAS-1) expresszióra fokozó hatást gyakorolt. Az 1-es típusú hialuronidáz (HYAL1) és a sejt migrációt indukáló fehérje (CEMIP) expressziója egyaránt csökkent a differenciálódást követően. Ezzel szemben a transzmembrán protein 2 (TMEM2) expressziója 72 órás TGF- β 1 kezelés hatására jelentősen emelkedett. Kimutattuk továbbá, hogy a nagy molekulatömegű HA (HMW-HA) aránya a TGF- β által indukált transzdifferenciálódást követően nőtt.

A glükokortikoidok egyike sem befolyásolta a fibroblasztok proliferációját, továbbá a PDGF-BB okozta proliferáció fokozódásra sem voltak hatással. A hidrokortizon volt az egyetlen GC, amely jelentősen növelte a HAS1 expressziót, míg mindegyik glükokortikoid csökkentette a kezelt sejtvonalak HAS2 és HAS3 mRNS expresszióját. A legmagasabb alap HAS2 szinttel a dermalis fibroblasztok (DF) rendelkeztek. A HYAL1 expresszió minden esetben csökkent a glükokortikoid kezelés hatására, míg a HYAL2 expresszióját egyik kezelés sem befolyásolta. A glükokortikoidok eredettől függő mértékben csökkentették a különböző fibroblaszt vonalak HA termelését, önmagukban adva és PDGF-BB kezelést követően egyaránt. A csökkentő hatás DF-ok esetén kifejezettebb volt. Csupán a metilprednizolon és a dexametazon csökkentette a PDGF-BB által indukált HAS2 és HAS3 expresszió fokozódást, míg egyik glükokortikoid sem befolyásolta a PDGF-BB-stimulált HAS1 expressziót. A PDGF-BB kezelés HYAL1 csökkentő hatását egyetlen alkalmazott GC sem volt képes gátolni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Nagy V. Endre professzornak, aki irányította munkámat az elmúlt évek során, és lehetővé tette, hogy az általa vezetett endokrin kutatócsoportban dolgozzak.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Belgyógyászati Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Balla Józsefnek, amiért lehetőséget biztosított arra, hogy az Intézet keretein belül végezhessem kutatómunkámat.

Hálával tartozom Dr. Katkó Mónikának a kísérletek részleteinek tervezése és a mérések során, valamint a tudományos publikációk összeállításában nyújtott értékes segítségéért.

Ugyancsak szeretném megköszönni a Belgyógyászati Intézet Endokrinológia-Anyagcsere Kutatólaboratórium valamennyi munkatársainak segítségét és támogatását.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Steiber Zitának, Dr. Ujhelyi Bernadettnek és Dr. Gyóry Ferencnek, akik kutatásomhoz a sejtvonalak létrehozásához szükséges szövetmintákat biztosították.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik az évek során mellettem álltak.



Nyilvántartási szám: DEENK/564/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Papp Fruzsina Réka

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Papp, F. R.**, Katkó, M., Csiki, R., Galgóczi, E., Molnár, Z., Erdei, A., Bodor, M., Steiber, Z., Ujhelyi, B., Nagy, E. V.: Characteristics of Hyaluronan Metabolism During Myofibroblast Differentiation in Orbital Fibroblasts.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 65 (13), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.65.13.13>
IF: 5 (2023)
2. Galgóczi, E., Katkó, M., **Papp, F. R.**, Csiki, R., Csiha, S., Erdei, A., Bodor, M., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Győry, F., Nagy, E. V.: Glucocorticoids Directly Affect Hyaluronan Production of Orbital Fibroblasts: a Potential Pleiotropic Effect in Graves' Orbitopathy.
Molecules. 28 (1), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28010015>
IF: 4.6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,6

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,6**

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, 2024.11.12.

