

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ ORBITA FIBROBLASTOK SZEREPE AZ
ENDOCRIN ORBITOPATHIA PATHOGENESISÉBEN**

Galgóczi Erika

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

A FIBROBLASTOK SZEREPE AZ ENDOCRIN ORBITOPATHIA PATHOGENESISÉBEN

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

Írta: Galgóczi Erika okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Anyagcsere és endokrin betegségek megelőzése és kontrollja programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Igaz Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Ilyes István, az MTA doktor

A doktori szigorlat időpontja: 2021. április 27. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bakó Gyula, az MTA doktora
Dr. Gereben Balázs, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Igaz Péter, az MTA doktora
Prof. Dr. Ilyes István, az MTA doktor
Prof. Dr. Bakó Gyula, az MTA doktora
Dr. Gereben Balázs, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2021. április 27. 13 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze az galgoczi.erika@gmail.com e-mail címre küldött üzenetben 2021. április 25. 12:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Bevezetés

Az endocrin orbitopathia (EOP) a Graves-Basedow (GD) kóros betegek 20-30 %-ában jelenik meg, és az orbita szövetek autoimmun gyulladása és szerkezetének átrendeződése jellemzi. A betegek többségében a külső szemizmok megvastagodása és a zsíros kötőszövet felszaporodása jellemző. Az EOP klinikai képét a csontos orbitában található szövetek térfogat-növekedése okozza. Az periorbitalis oedemas, duzzadt izmok és kötőszövet és a csontos orbita közötti térfogatbeli eltérés eredményeként a szövetek az orbita frontális nyílása felé „tolódnak”, ami előidéz a szem axiális protrúzióját. A látást közvetlenül veszélyeztető keratitis megjelenhet a súlyos és hosszantartó proptózis esetén, míg a látóideg neuropathiáját a látóideg kompressziója okozza. Az autoimmun folyamatok elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblastok, amelyeket az infiltráló immunsejtek, illetve az általuk termelt citokinek és növekedési faktorok aktiválnak. Ennek az folyamatnak az eredménye a fibroblastok fokozott proliferációja és hyaluronan (HA) termelése, ez utóbbi eredményeként az extracelluláris mátrix (ECM) átrendeződése. Később az érett adipocytává történő differenciálódása irányába megy a folyamat. A plasminogén aktivátor inhibitor 1 (PAI-1) szerepe, mely csökkenti az ECM komponenseinek degradációját és ezáltal növeli a mátrix stabilitását, az EOP pathogenesisében nem volt ismert. 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. Minden olyan beavatkozás, ami csökkenti a helyi HA termelést, csökkentheti az orbitában kialakuló térfogat-növekedést, és ezzel beavatkozhat a EOP pathogenesisébe. A 4-metilumbelliferont (4-MU) sikeresen használják állatmodellben,

autoimmun, krónikus gyulladásos és daganatos betegségekben a HA termelés csökkentésére. Gyógyszerként, mint spazmolitikum, Európában számos országban elérhető, nem vényköteles.

Irodalmi áttekintés

Az endocrin orbitopathia (EOP) autoimmun pajzsmirigy betegségekhez, leggyakrabban Graves-Basedow kórhoz (GD) társuló kórkép. Az EOP jellemzően az orbita kötőszövet felhalmozódásával és a külső szemizmok megvastagodásával jár. A betegség korai, ugyanakkor legfőbb és leggyakoribb tünete a retrobulbáris fájdalmas nyomásérzés, amely súlyosan rontja a betegek életminőségét. A fájdalomérzet oka a felszaporodott kötőszövet, a megvastagodott szemizmok és a megnövekedett intraorbitalis nyomás. A beteg vizsgálata során kettős látás, fokozott könnyezés, fényérzékenység, exophthalmus, a felső szemhéj retractiója, a periorbitalis oedema, a conjunctiva hyperaemiája lehet jelen.

Számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy az orbita fibroblastok (OF) az autoimmun folyamatok elsődleges célpontjai EOP-ban. Az aktiváció következtében nő az OF proliferációs rátája és HA termelése, gyulladásos faktorokat termelnek, később adipocytává, illetve miofibroblastokká differenciálódnak. Az ECM egyes komponenseinek kóros felhalmozódása, az orbita tartalom átrendeződéséhez vezet. Számos citokint és növekedési faktort mutattak ki az EOP-ban szenvedő betegek orbita szöveteiben.

Az orbita fibroblastok fokozott proliferációja, ECM komponenseinek (főleg HA) termelése és adipocytává vagy myofibroblastokká történő differenciálódása határozza meg az orbita szöveteinek térfogat-növekedését. A fibroblastok proliferációja nagyban hozzájárul a szöveti átrendeződéshez és a fibrosis kialakulásához. 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. Az EOP lefolyása során megváltozik az ECM komponensek szintézisének és lebontásának egyensúlya az OF aktivációja miatt. A HA-nak esszenciális szerepe van a sejt-ECM és sejt-sejt közötti kölcsönhatásokban: A HA molekula ismétlődő alegységekből álló poliszacharid. Bioszintézise három transzmembrán glikoziltranszferáz izomenzim által valósul meg: a hialuronan szintáz (HAS) 1,2 és 3 által; és a hialuronidáz (HYAL) 1 és 2 vesz részt a lebontásába.

A PAI-1 szerepe, mely csökkenti az ECM komponenseinek degradációját és ezáltal növeli a mátrix stabilitását, az EOP pathogenesisében nem volt ismert. A PAI-1 expresszió sejtdenzitás függést mutat számos humán sejttípusban, például a preadipocytákban, bőr fibroblastokban, szintézise csökken a konfluens sejtszám irányába haladva. Az emelkedett PAI-1 expresszió eredménye az ECM felhalmozódása. Az EOP-ban szenvedő betegek orbita szöveteinek elemzése során kimutatták a PAI-1 gén fokozott átírását, mindez azt mutatja, hogy a betegség kialakulásában, illetve progressziójában e faktornak szerepe van. A plasminogén aktivátor rendszer és a PAI-1 szerepe, illetve kapcsolata a HA-val az EOP pathomechanizmusában még nem tisztázott.

A TGF- β fontos szerepet tölt be a sejtnövekedésben és a differenciálódásban, emellett szerepe van a szöveti regenerálódásban és az ECM termelés útján a fibrosis szabályozásában. Számos biológiai folyamatban részt vesz, például a sejtek proliferációjában, illetve az ECM felhalmozódásban. EOP-os betegek orbita szöveteiben fokozott TGF- β expressziót írtak le

közepesen súlyos és súlyos EOP esetén, amelynek a mennyisége pozitív korrelációt mutatott a CAS-al. Emellett emelkedett *PAI-1* expressziót találtak, amelyet számos cytokin és növekedési faktor szabályoz, többek között maga a TGF- β .

A 4-metilumbelliferon (4-MU) kedvezően befolyásolja állatmodelleken autoimmun és krónikus gyulladásos és daganatos megbetegedések lefolyását. A HA termelést bizonyítottan gátolja *in vitro*. Kétféleképpen csökkentheti a HA termelést: egyrészt annak egyik alkotó komponenséhez, a glükoronsavhoz kötődve kompetitív gátlást fejt ki, másrészt a HAS-ok mRNS expresszióját csökkenti. A 4-MU számos európai országban nem vényköteles gyógyszerként forgalomban van epehajtóként.

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

Enyhe EOP esetén a beteg követése mellett a szelén pozitív hatását bizonyították. Közepesen súlyos és súlyos EOP esetén immunszuppresszív terápia alkalmazása szükséges. Súlyos EOP-ban a látóideg kompressziója esetén nagy dózisú intravénás kortikoszteroid adása szükséges; ha 2 héten belül nem történik javulás, sürgős sebészeti beavatkozást tesz szükségessé az orbita csontos falának elvételével.

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 kontroll 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.

Módszerek

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 Helsinki Deklarációnak megfelelően végeztük el, és a résztvevő betegek beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

Öt EOP-ban szenvedő beteg dekompresziós műtete során eltávolított orbita kötőszövetből öt primer orbita fibroblast sejtvonalat hoztunk létre. A kontroll orbita kötőszöveteket négy beteg nem pajzsmirigy betegséghez kapcsolódó szemműtete (enukleáció) során eltávolított kötőszövetből nyertük. A bőr szöveteket négy hasfali sérv műtét során nyertük.

Az orbita fibroblast vonalakat a Bahn és munkatársai által korábban leírt metodika alapján hoztuk létre. A kötőszövet darabokat 2x2 mm-es darabokra vágtuk, majd mostuk antibiotikum tartalmú PBS-ben, és a szövetdarabokat Petri csészébe helyeztük. A tenyészet proliferációs potenciáljától függően, a szövetdarabokat eltávolítottuk 2-4 hét után. A felszaporítást 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 szélesztettük hat különböző denzitással, amelyek a következők: $6,24 \times 10^4$, $3,12 \times 10^4$, $1,56 \times 10^4$, $7,8 \times 10^3$, $3,9 \times 10^3$ és $1,95 \times 10^3$ sejt/cm². 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 a 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 M199-ben, a 4-MU-t és 4-metilumbelliferil-glukoronidot (4-MUG) dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és így adtuk a tenyésztő oldatokhoz.

A sejtproliferációs vizsgálathoz a *Cell Proliferation ELISA BrdU Colorimetric Kit*-et, a sejtek metabolikus aktivitásának méréséhez *EZ4U*-t, a cytotoxicitás vizsgálat során *Vybrant Cytotoxicity Assay Kit*-et, a kaszpáz aktivitás meghatározásához a kereskedelmi fogalomban kapható *Caspase-Glo 3/7* kiteket használtuk a gyártó által kiadott útmutatónak megfelelően. A felülúszóba került PAI-1 fehérje és HA szintek meghatározásához *DuoSet Human Serpin E1/PAI-1* illetve *DuoSet Hialuronan* kiteket használtuk a gyártó által kiadott útmutatónak megfelelően. A pericelluláris HA meghatározáshoz a sejteket trypsin–EDTA oldattal kezeltük. A sejtuszpenziót 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 $\text{ng}/10^5$ sejtre normalizáltuk. Az abszorbanciát és a fluoreszcenciát *Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detektorral* mértük. Minden esetben a kezeltetlen tenyészetek mért értékeihez hasonlítottuk a kezelt tenyészetek abszorbancia értékeit.

A 24 lyukú plate-ben lévő sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, majd PBS-el kétszer mostuk. A plate aljában lévő sejteket a TRI reagensben lizáltuk, majd az RNS izolálásig a mintákat -20°C -on tároltuk. A kiolvasztott mintákat homogenizáltuk, és $100\ \mu\text{l}$ kloroformot adtunk hozzá $16\ 000\ \text{G}$ -n centrifugáltuk 15 percig. A felső vizes fázist új DNáz és RNáz mentes Eppendorf csőbe pipettáztuk. $375\ \mu\text{l}$ 100%-os izopropanolt adtunk hozzá a vizes fázisban található RNS precipitációjához, majd $16\ 000\ \text{G}$ -n centrifugáltuk 10 percig. A következő lépésben a felülúszó eltávolítása után a pellet mosása következett $1\ \text{ml}$ hideg 75%-os etanollal. Befejező lépésként centrifugálás következett $12\ 000\ \text{G}$ -n 10 percig. A teljes felülúszó eltávolítása után az izolált RNS-t nukleáz-mentes vízben oldottuk, és koncentrációját *NanoDrop* segítségével mértük, majd -20°C -on tároltuk az reverz transzkripció kivitelezéséig. A tisztított RNS mintákat *High Capacity*

cDNA Reverse Transcription Kit felhasználásával cDNS-sé írtuk át a gyártó leírásának megfelelően. A *TaqMan Gene Expression Assay* 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 CFX96 rendszerén* végeztük. Az eredményeket a *GAPDH* mRNS expressziós szintjéhez normalizáltuk a ΔCT metodikát alkalmazva.

A statisztikai elemzéseket a *STATISTICA 7* software használatával végeztük (StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA). Az adatokat minden esetben az átlag $\pm$ SD értékkel ábráztuk. Ismételt méréses 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.

Eredmények

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. Az egységnyi sejtre eső PAI-1 fehérje mennyisége csökkent a növekvő sejtdenzitással; 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 denzitáson is folyamatosan csökkent. Megállapítottuk, hogy a származási helytől függetlenül a növekvő sejtdenzitás a PAI-1 termelés negatív regulátora a vizsgált sejtvonalak esetében. A *PAI-1* mRNS expresszió szintje párhuzamosan csökkent a PAI-1 fehérje

koncentrációjával a növekedő sejtdenzitások felé haladva. A *PAI-1* mRNS expressziója különbözött az eltérő származási helyű sejtvonalak esetében ($p < 0,01$): csökkenő sorrendben bőr fibroblastok > kontroll OF > EOP OF. A felülúszóban és a pericelluláris térben 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 nagyobb mennyiségű HA-t termelnek, mint a kezeletlen OF (bőr vs. kontroll $p < 0,01$; bőr vs. EOP $p < 0,001$). Hasonló eredményeket kaptunk a pericelluláris HA szintek vizsgálata során (bőr vs. kontrol $p = 0,013$, 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 ($p = 0,06$). 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 $r = 0,97$, $p < 0,000001$). A *hialuronan szintáz 1 (HAS1)* és *hialuronan szintáz 3 (HAS3)* expressziók azonos nagyságrendűek, míg a *hialuronan szintáz 2 (HAS2)* a legnagyobb mennyiségben expresszált enzim minden vizsgált sejtvonal esetében. A HAS enzimek expressziós mintázata sejttípusonként eltérő. A kezeletlen bőr fibroblastok magasabb *HAS1* és *HAS2* mRNS 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 mutattak, mint a kontroll OF-ok. A bőr fibroblastok *HAS1* és *HAS2* expressziója a növekvő sejtdenzitással csökkent. A *hialuronidáz 1 (HYAL1)* mRNS expressziója sokkal változatosabb képet mutatott, mint a *hialuronidáz 2 (HYAL2)* expressziója. A kezeletlen bőr fibroblastok rendelkeztek a legalacsonyabb alap *HYAL1* expressziós szintekkel, és a EOP OF *HYAL1* expresszója alacsonyabb volt, mint a kontroll

OF esetében. Alacsonyabb de nem szignifikáns tendenciát láttunk a konfluens tenyészetek *HYAL1* és *HYAL2* termelésében a poszt- vagy prekonfluens tenyészetekéhez viszonyítva.

A fibroblastok proliferációs rátája csökkent 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 kivételével, 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.

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

A kísérletek során a TGF- β koncentrációját 0,01–10,0 ng/mL-es tartományban vizsgáltuk konfluens tenyészetek esetében. Az 1 ng/mL és az ennél magasabb koncentrációk esetében a PAI-1 termelésre kifejtett hatás már nem különbözött egymástól. 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. A TGF- β kezelésnek a PAI-1 expresszióra kifejtett stimuláló hatásának sejtdenzitás függése az OF-ra jellemző, a bőr fibroblastokra nem. A legnagyobb orbita fibroblast denzitások esetében a TGF- β kezelés eredményeképpen 5-szörös növekedést találtunk a PAI-1 mennyiségében. TGF- β kezelést követően 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* gátló hatása a TGF- β kezeléssel részben visszafordítható.

A TGF- β stimuláló hatását tekintve a legnagyobb denzitáson találtunk különbséget a HA termelésben ($p < 0,0001$), és ez a hatás nem függött a fibroblastok származási helyétől. Ugyanez igaz az OF pericelluláris HA szintézisére is, 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 ($p < 0,0001$).

A *HAS1* expressziója sejtdenzitás függő módon emelkedik ($p = 0,03$) kifejezettebben az orbita fibroblastok esetében, 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* mRNS expressziójában az orbita fibroblastok esetében a legnagyobb denzitáson 500-600-szoros növekedést tapasztaltunk, míg a bőr fibroblastok esetén ez csak kb. 10-szeres volt.

A TGF- β kezelés csak a legnagyobb sejtdenzitáson fokozta a proliferációt ($p < 0,01$). 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 ($p = 0,04$).

4-metilumbelliferon (4-MU) kezelés hatása a fibroblastok HA termelésére

A kísérletek során a 4-MU koncentrációját 0,125–6,0 mmol/L-es tartományban vizsgáltuk. A vizsgált koncentráció tartományban az 1 mmol/L koncentráció váltotta ki a maximális hatást 24 órás kezelést követően. A 4-MU kezelés hatékonysága független a sejtsűrűségtől ($p = 0,931$). Erős gátló hatást tapasztaltunk, az egységnyi sejt által termelt HA mennyisége szignifikánsan csökkent a 4-MU kezelés után. 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, $85,4 \pm 2,8$ % a EOP OF és $91,3 \pm 1,2$ % a bőr fibroblastok esetében. 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 ($p = 0,352$). A pericelluláris HA termelésben is különbséget találtunk a kezelést követően OF esetében. A 4-MU metabolitja a 4-metilumbelliferil-glukoronid (4-MUG) nem gátolta a HA termelést.

A *HAS1* alap expressziója rendkívül alacsony értéket mutatott minden vizsgált sejtvonalon. Nincs különbség az alap *HAS2* expressziókban az eltérő származási helyek függvényében ($p = 0,654$). A 4-MU kezelés minden sejtvonal esetében csökkentette a *HAS2* expressziót ($p < 0,001$), azonban a hatékonyságban nincs különbség (ANOVA $p = 0,268$). Az átlagos csökkenés 72 ± 12 %, 76 ± 18 % és 91 ± 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 kezelés 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% 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 ($p = 0,042$). 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 ($p = 0,353$). 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-ban, 160 ± 24 % a EOP OF-ban, és 135 ± 24 % a bőr fibroblastokban.

A 4-MU kezelés során a csökkenés a proliferációs rátában 78 ± 8 % kontroll OF, 61 ± 12 % EOP OF és 80 ± 3 % a bőr fibroblastok esetében 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 ($p = 0,259$). A metabolikus aktivitás csökkent a 4-MU kezelés hatására: 29 ± 18 % kontroll OF-ban, 34 ± 11 %, az EOP OF-ban, és 30 ± 10 % bőr fibroblastokban. A hatás nem függött a sejtek származási helyétől.

A cytotoxicitás vizsgálat a sejtekből apoptózis vagy nekrozis esetén felszabaduló glükóz-6-foszfát (G6PD) enzim reakcióján alapul. A kezeletlen tenyészetek esetében a nekrozis/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.

4-MU és TGF- β kezelés együttes hatása

A TGF- β által kiváltott HA termelés növekedés minden vizsgált sejtvonal esetében szignifikáns volt és a TGF- β stimulált HA növekedést csökkentette a 4-MU kezelés. 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 ($p = 0,242$). A TGF- β által kiváltott *HAS1* mRNS expresszió növekedés csökkent 4-MU kezelés hatására. A *HAS2* és *HAS3*, illetve a *HYAL1* és *HYAL2* esetében nem találtunk különbséget a TGF- β stimuláció után a 4-MU-val kezelt és kezeletlen fibroblastok között.

Megbeszélés

Az orbita fibroblastokat tekinthetjük a EOP autoimmun folyamatai elsődleges célpontjának, mivel az orbita kötőszövetet infiltráló immunsejtek által termelt citokinek aktiválni képesek azokat. Az aktivált orbita fibroblastok nagy mennyiségben termelik az ECM komponenseit és fokozottan proliferálnak. A HA felhalmozódása az orbitában önmagában, de magas vízkötő képessége miatt még kifejezettebben, a szövetek duzzanatát idézi elő és elősegíti a gyulladásos immunsejtek infiltrációját. Az egyensúly fenntartása az ECM szintézise és degradációja között jelentős részben a PAI-1 feladata. Az EOP pathomechanizmusa során a HA túltermelése egy 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, származási helytől függetlenül. Az kontakt gátlás általános jelenség, mely szabályozza a sejtek proliferációját. Feltételezzük, hogy az általunk létrehozott rendszerben a konfluens tenyészetek modellezzik az egészséges orbitában található sejteket, míg a prekonfluens tenyészetek hasonlítanak a magas ECM termelésű, magasabb proliferációs rátával rendelkező fibroblastokra. Azt találtuk, hogy az orbita fibroblastok magasabb proliferációs kapacitással rendelkeznek, mint a bőr fibroblastok. 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. Tudomásunk szerint kutatócsoportunk írta le elsőként, hogy az orbita fibroblastok így viselkednek. Az orbita fibroblastok proliferációs állapota a különböző denzitások esetében a PAI-1 expresszió fő meghatározója.

Feltételezzük, hogy a TGF- β lehet az egyik olyan citokin, amely felelős az orbita kötőszövetben bekövetkező változásokért. A TGF- β -ról ismert, hogy transzkripciós szinten szabályozza a sejt növekedést, a sejtek mozgását, a ECM átalakulását és a pericelluláris proteolitikus aktivitást, stimulálja a PAI-1 transzkripcióját és képes fokozni olyan gének átírását, amelyek az ECM komponenseit kódolják. Ezen felül a TGF- β bizonyítottan jelen van a EOP betegek orbitájában. Eredményeink azt mutatják, hogy a TGF- β a PAI-1 szintézis potenciális stimulátora az orbita fibroblastokban minden vizsgált sejtdenzitáson, és a PAI-1 szintjében ötszörös emelkedést okoz a magas denzitásokon. Úgy véljük, hogy a magas PAI-1 koncentráció a EOP orbitákban a megnövekedett mátrix stabilitásáért felelős, ezzel hozzájárulva az ECM

mennyiségének és a fibroblastok proliferációs potenciáljának növekedéséhez.

Az egységnyi sejtre jutó HA termelés nem mutat sejtdenzitás függő mintázatot, de nagyban függ a fibroblastok származási helyétől. Az egyes HAS enzimek expressziós mintázata is különbözik a három sejttípus esetében. A HAS-ok transzkripció szintjén bekövetkező változások nem mindig korrelálnak a HA szekrécióval. A sejtek TGF- β hozzáadására megnövekedett HA termeléssel válaszoltak a magasabb denzitásokon, és ezzel párhuzamosan a PAI-1 termelésük is növekedett. 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 eredetű szövetek között. Megerősítettük, hogy a TGF- β kezelés fokozza a *HAS1* mRNS expressziót. A betegség lefolyása szempontjából a TGF- β hatására a magasabb denzitásokon bekövetkező mátrix túltermelés hátrányosan hathat. A HA felhalmozódása kikapcsolhatja a kontakt-gátlást és emelkedett proliferációs potenciált válthat ki. 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. Eredményeink azt mutatják, hogy a növekvő sejtdenzitás által kiváltott PAI-1 szintézis csökkenést a TGF- β részlegesen gátolja.

Céljaink között szerepelt egy olyan hatóanyag azonosítása, mely képes a megnövekedett HA szintézis gátlására, még stimulált körülmények között is. Összhangban a korábban más sejtvonalakon végzett kutatásokkal 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 kompetitív inhibitor jelenléte nemcsak a HA szintézisre van hatással, hanem az orbita fibroblastok hialuronan szintázainak és a hialuronidázainak transzkripciós szintjeire is. A HA szintézist befolyásoló hatás független a fibroblastok származási helyétől, 4-MU hatására minden esetben csökkent a HA mennyisége a felülúszóban. Ezenfelül a csökkent HA szintézise kapcsolatban áll az erősen csökkenő proliferációs potenciállal. Ez a két tényező együttesen hozzájárulhat ahhoz, hogy a 4-MU-t mint potenciális terápiás szert használhassuk a EOP kezelésében.

Az anatómiai származási helytől függ a fibroblastok hialuronan szintáz expressziós mintázata. A bőr fibroblastok magasabb *HAS1* expresszióval rendelkeznek, mint a kontroll vagy EOP orbita fibroblastok. A *HAS3* mintázata csökkenő sorrendben EOP OF > kontroll OF > bőr fibroblastok. A *HAS2* a legnagyobb mennyiségben expresszálandó izoformája az enzimnek, ami a HA termelésért felelős az orbita fibroblastokban; az mRNS koncentrációja két nagyságrenddel nagyobb mint a másik két izoforma (*HAS1*, *HAS3*) esetében. A HA koncentráció növekedéséért nem a csökkent degradáció, hanem a HAS enzimek túltermelődése felelős.

Azt találtuk, hogy a 4-MU még TGF- β által stimulált körülmények között is képes a bőr és orbita fibroblastok HA termelésének csökkentésére. A 4-MU közvetlen hatása a *HAS* génjeire egyelőre tisztázatlan. Vizsgálatunkban a 4-MU csökkentette a *HAS1* és *HAS2* expressziót, miközben a *HAS3* szintje változatlan maradt. A HAS-ok mellett a hialuronidázok expresszióját is befolyásolja. Emelkedett *HYAL2* expressziót találtunk a 4-MU kezelés hatására, amely gyorsíthatja a HA lebontás első lépéseit, ami kedvező hatású lehet az EOP lefolyása során. Eredményeink arra utalnak, hogy 24 órás 4-MU kezelés nem növeli az apoptózis szintjét sem az

orbita, sem a bőr fibroblast tenyészetek esetében, de további vizsgálatok szükségesek ennek egyértelmű tisztázására. A maximális gátló hatás eléréséhez szükséges 4-MU koncentráció az általunk vizsgált tenyészeteken nem toxikus a fibroblastokra. A cytotoxicitás vizsgálatokat alapul véve megjegyezzük, hogy a formazán átalakuláson alapuló metabolikus aktivitás vizsgálatok általában túlbecsülik a 4-MU hatását a sejt életképesség szempontjából.

A 4-MU fent említett tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy az EOP kezelésében egy új potenciális 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, így a 4-MU pozitívan befolyásolhatja az EOP kialakulását és lefolyását. A 4-MU kezelés hatással lehet a sejt-sejt kölcsönhatásokra, amelyek az antigén prezentációban fontosak. Ugyancsak befolyásolhatja az adipogenezist; az adipogenezist HA felhalmozódás és az emelkedett *HAS2* expresszió kíséri.

Az egyik potenciális gyenge pontja a vizsgálatunknak annak *in vitro* jellege. Az emberi orbitában sokkal összetettebb a környezet: a szisztémás immun, endokrin, és a lokális faktorok, a nagyobb szöveti nyomás és a vérellátás változása együttesen vannak jelen. Mindazonáltal ezen tényezők bármelyike potenciális beavatkozási pont lehet a betegség pathomechanizmusa során.

Összefoglalás

Az endocrin orbitopathia (EOP) az autoimmun pajzsmirigy betegségek 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 sejtdenzitás-növekedése negatív regulátora a proliferációnak és a PAI-1 szekréciónak kontroll és EOP orbitából származó fibroblastokon egyaránt. A növekvő sejtdenzitással csökkent az egységnyi sejt által termelt *PAI-1* mRNS expressziója is minden vizsgált sejtvonal esetében. A PAI-1 termeléssel ellentétben a fibroblastok által termelt egységnyi sejtre eső HA mennyisége viszont nem mutat denzitásfüggést.

A TGF- β stimulálja a *PAI-1* expressziót, mely hatás a növekvő sejtdenzitással fokozódik orbita fibroblastok esetén, míg a bőr fibroblastoknál nincs jelen. A TGF- β hatására növekvő HA termelés 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-MU kezelés. A 4-MU kezelés növelte a *HAS3* és *HYAL2* expressziót, míg a *HAS2* expresszióban csökkenést találtunk minden sejtvonal esetében. A *HYAL1* esetében nem tapasztaltunk változást. Az EOP és az egészséges orbitából származó fibroblastok azonosan viselkedtek. A 4-MU gátolta mind az alap, mind pedig a TGF- β stimulált HA termelést, és csökkentette a proliferációs potenciált minden vizsgált fibroblast esetében.

Mivel a EOP-nak nincs megfelelő állatmodellje, klinikai vizsgálatok szolgálhatnak további információval a gyógyszerként történő alkalmazhatóságáról EOP-ban. Minden beavatkozás, amely a HA túltermelődését csökkenti, kedvező lehet az EOP kezelésében.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni **Prof. Dr. Nagy V. Endre** tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy témavezetőként munkámat irányította. Köszönettel tartozom neki munkám anyagai és szakmai feltételeinek megteremtéséért és a tudományos publikációk elkészítésében nyújtott értékes segítségéért. Köszönetemet szeretném kifejezni **Prof. Dr. Paragh Györgynek**, a Belgyógyászati Intézet korábbi, és **Prof. Dr. Balla Józsefnek**, a Belgyógyászati Intézet jelenlegi igazgatójának, amiért lehetővé tette, 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 előkészítése során nyújtott értékes 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-Anyagsere 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 a munkám elvégzéséhez.

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.



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., Györy, 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/iovs.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., Györy, F., Berta, E., Nagy, E. V.: Cell density dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF- β 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., Némethi, 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.

