

37. OTDK Biológia Szekció

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Klinika

ELKH-SZTE Lendület Eritél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport

Primer humán intesztinális fibroblaszt sejtkultúra létrehozása és karakterizálása gyulladásos bélbetegségben

Kajári Lilian

Biológia Bsc

III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Maléth József - tudományos főmunkatárs

Dr. Jójárt Boldizsár – tudományos segédmunkatárs



Szeged

2025

1 Rövidítések

ACTA2 – aktin alpha 2

CD – Crohn-betegség

COL1A1 – 1-es típusú kollagén alfa 1

CTGF – Kötőszöveti növekedési faktor

CU – Colitis ulcerosa

DMEM – Dulbecco módosított eagle médium

DMSO – dimetil-szulfoxid

dNTP – dribonukleozid-trifoszfát

DSS – dextrán-szulfát-nátriumsó

ECM – Extracelluláris mátrix

EMT – epitheliális mezenchimális tranzíció

EnMT – endoteliális mezenchimális tranzíció

EpCAM – Epitheliális sejtheadhéziós molekula

FBS – fetális borjú szérum

FGF – Fibroblast növekedési faktor

FN1 – Fibronectin 1

H3C4 – Hisztón 3 klaszter 4

IBD – Inflammatory Bowel Disease – gyulladásos bélbetegség

IGF – Insulinszerű növekedési faktor

IL33 – Interleukin 33

JAK – Janus kináz

MMP – Mátrix metalloproteináz

PAI-1 – Plazminogén aktivátor inhibitor 1

PDGF – Vérlemezke eredetű növekedési faktor

PHH3 – Foszfohisztón H3

RPS23 – 23-as riboszómális fehérje

TGF- β – Transzformáló növekedési faktor béta

TNBS – 2,4,6-trinitrobenzenszulfonsav

TNF α – Tumor nekrosis faktor alfa

VE-cadherin – Vaszkuláris endotheliális cadherin

α -SMA – Alfa sima izom aktin

2 Tartalomjegyzék

1	Rövidítések.....	2
2	Tartalomjegyzék.....	4
3	Összefoglaló	6
4	Bevezetés	7
4.1	A gyulladásos bélbetegségek általános jellemzése és klinikai jelentősége.....	7
4.2	Az IBD epidemiológiája.....	7
4.3	IBD terápiás lehetőségei	8
4.4	Fibrózis patomechanizmusa.....	8
4.5	Az IBD és a fibrózis viszonya	10
4.6	A gyulladás következtében kialakuló fibrózis molekuláris mechanizmusa ..	11
4.7	A fibrózis kezelési stratégiák.....	12
4.8	Jövőbeli, kísérleti gyógyszerjelöltek a fibrózis kezelésére.....	13
4.9	A fibrózis kutatására alkalmazott modellek.....	13
5	Célkitűzések.....	15
6	Módszerek bemutatása	16
6.1	Primer humán fibroblaszt sejtkultúra létrehozása és fenntartása.....	16
6.2	Immunfluoreszcens festés.....	18
6.3	Génexpressziós vizsgálatához alkalmazott módszerek.....	19
6.3.1	RNS izolálás	19
6.3.2	Reverz transzkripció cDNS létrehozásához.....	19
6.3.3	Primer tervezés és vég-pont analízis PCR	20
6.3.4	Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)	21
6.4	Statisztikai elemzés	22
7	Eredmények.....	23
7.1	Primer humán intesztinális fibroblaszt sejtkultúra létrehozásának és fenntartásának optimalizálása	23
7.2	A sejtkultúra mezenchimális eredetének igazolása	23
7.3	Primer humán fibroblaszt sejtkultúra fibrotikus fenotípusának vizsgálata .	24
7.4	A primer humán vastagbél sejtkultúrák fibrózisos génexpresszió analízise .	27

8	Diszkusszió.....	29
9	Köszönetnyilvánítás	31
10	Irodalomjegyzék.....	32
11	Tételes szerzői hozzájárulás	40

3 Összefoglaló

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) a gyomor-bél traktus krónikus immun-mediált betegségei. Az intesztinális fibrózis gyakori szövődménye hosszan fennálló krónikus gyulladásnak, amelynek következtében az extracelluláris mátrix fehérjéi felhalmozódnak a szövetben. Ez felszívódási zavarokhoz, bélmotilitási problémákhoz vezet, valamint manifesztálja a szűkületek és bélelzáródás kialakulását. Gyógyszeres terápia egyelőre nem áll rendelkezésre, csak sebészeti beavatkozás alkalmazható. Pontos patomechanizmus nem ismert, nincs primer *in vitro* fibroblaszt modell. Kutatásunk **célja**, egy primer humán fibroblaszt sejtkultúra létrehozásának optimalizálása és annak karakterizálása.

A sejtkultúra létrehozásához fibroblaszt sejteket és kriptákat izoláltunk vastagbéltükrözés során levett kontroll és IBD-s biopsziás mintákból. Minden sejtenyészetet háromszor passzáltunk. Az *in vitro* fibrózisra jellemző fenotípus vizsgálatához immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Célfehérjék: COL1A1 (Kollagén 1 alfa 1), TGF- β 1 (Transzformáló növekedési faktor béta), PAI-1 (Plazminogén aktivátor inhibitor 1), α -SMA (Alfa-simaizom aktin) és PHH3 (Foszfohiszton H3). Mindemellett, a mintákból RNS-t izoláltunk és a megfigyelni kívánt génekhez (COL1A1, ACTA2 (Aktin alfa 2), TGF- β 1, FN1 (Fibronektin 1), PAI-1, H3C4 (H3 klaszterezett hiszton 4)) primereket terveztünk. A genotípust qRT-PCR technikával határoztuk meg.

Hatékonyan tudtunk humán vastagbél primer fibroblaszt sejtkultúrákat létrehozni és fenntartani a harmadik passzálig. A fibrotikus markerek, a COL1A1, TGF- β 1 és PAI, valamint a PHH3 proliferációs marker fluoreszcens intenzitása szignifikánsan magasabb volt az IBD-s eredetű fibroblaszt kultúrákban. Azonban, a génexpressziós vizsgálat során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két csoport között.

Vizsgálatunk során, sikeresen hoztunk létre primer humán fibroblaszt sejt kultúrát az általunk optimalizált protokollal. Fehérje szinten, a fibrózis markerek megkülönböztetik a beteg mintákat az egészségesektől. Azonban a génexpressziós elemzés nem tesz különbséget, az IBD eredetű fibroblaszt kultúrák elveszíthetik fibrotikus genotípusukat a harmadik passzáásra.

4 Bevezetés

4.1 A gyulladásos bélbetegségek általános jellemzése és klinikai jelentősége

A gyulladásos bélbetegségek - Inflammatory Bowel Diseases (IBD) - a gasztrointesztinális traktust érintő gyulladásal járó krónikus kórképek. Két jól elkülöníthető típusa a Crohn-betegség (CD) és a Colitis ulcerosa (CU). A betegségre jellemző a remissziós és a relapszusos időszakok folytonos váltakozása (Wallace, 2014).

A Crohn-betegség a bél transzmurális, a bélfal minden rétegét érintő gyulladásos betegség. A gasztrointesztinális rendszerben bárhol kialakulhat a szájtól a végbélnyílásig, de leggyakrabban a terminális ileum érintett. Tünetei a véres hasmenés, alhasi fájdalom és a felszívódási zavarok okozta testsúlyvesztés (Freeman, 2014).

Az IBD másik leggyakrabban diagnosztizált típusa a Colitis ulcerosa. A CU nem transzmurális, a CD-vel ellentétben, ebben az esetben csak a vastagbél mukóza rétege érintett. Tünetei lehetnek a vér és nyálka a székletben, illetve a testtömeg csökkenése (Yu & Rodriguez, 2017).

A betegség mindkét fajtájára jellemző, hogy előrehaladott állapotában súlyos komplikációk is kialakulhatnak, bélszűkületek, elzáródások, valamint fekélyek kialakulása, melyek a bélfal kilyukadásához, perforációjához vezethetnek (Bousvaros A, 2007).

Manifesztációja multifaktoriális, jellemzően környezeti- és genetikai faktorok, továbbá a sérült epiteliális barrier befolyásolják. Azonban az egyik legfontosabb a citokin homeosztázis felborulása, mely során a gyulladáskeltő és a gyulladáscsökkentő citokinek közötti egyensúly a gyulladás irányába billen (Rieder & Fiocchi, 2009).

4.2 Az IBD epidemiológiája

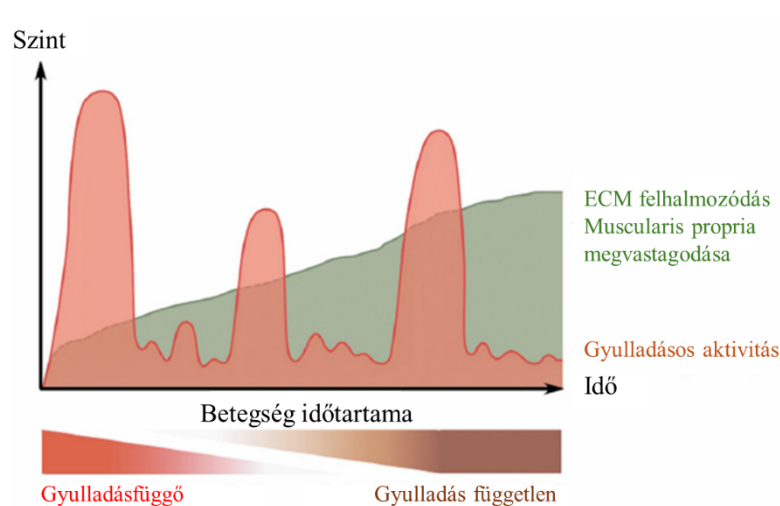
A világon több, mint 5 millió jelentett IBD beteg élt egy 2019-ben megjelent felmérés szerint. (Dharni és mtsai., 2024). Azonban mára a páciensek száma meghaladhatja a 10 millió főt is a Crohn-betegség és Colitis ulcerosa Egyesületek Európai Szövetsége (European Federation of Crohn's and Ulcerative Colitis Associations - EFCCA) statisztikái alapján. A legnagyobb része ezen betegeknek Észak Amerikában és Nyugat Európában él. Európában a lakosság 0,4%-a azaz nagyjából 2,5 millió ember érintett a betegségben (Kumar és mtsai., 2023). Hazánkban mintegy 45 ezer embert érint az IBD valamely formája. Ezáltal az egyik legnépesebb krónikus gyulladásos

betegségcsoport Magyarországon (MCCBE - Magyarországi Crohn-Colitises Betegek Egyesülete). A gyulladásos bélbetegségek előfordulása a nyugati világban a legmagasabb, a jelentett eseteket nézve ez 29,3 beteg 100.000 közül a CD-t tekintve és 24,3 a 100.000 közül CU esetében (Cosnes és mtsai., 2011).

4.3 IBD terápiás lehetőségei

Az elérhető gyógyszeres kezelések célja a betegség remissziójának indukálása és fenntartása, valamint a betegség másodlagos hatásainak enyhítése, nem pedig a mögöttes mechanizmus visszafordítása (Grisham, 1994). Az elsődlegesen bevetett amino-szalicilátokat, kortikoszteroidokat és immunmodulátorokat alkalmazó hagyományos kezeléseknek korlátjaik vannak, például gyakran hatásvesztés figyelhető meg és a páciensek nem reagálnak a kezelésre bizonyos idő után (Greuter és mtsai., 2021). Az 1990-es években bevezetett biológiai szerek, melyek monoklonális antitesteken alapulnak, jobb hatékonyságot és specificitást kínálnak, és olyan faktorokat céloznak meg, mint a TNF- α , integrinek és különböző citokinek (Di Rienzo és mtsai., 2024). Ezenkívül a Janus-kináz (JAK) gátlása alternatív stratégiaként jelenik meg az IBD-ben. Ezek kis molekulák, amelyek képesek modulálni a citokin jelátvitelt immunmediált betegségekben, amelyek szintén részt vesznek az IBD patogenezisében, például a tofacitinib egy alkalmazható gyógyszer olyan CU betegeknél, akik nem reagálnak biológikumokra és a hagyományos gyógyszerekre.

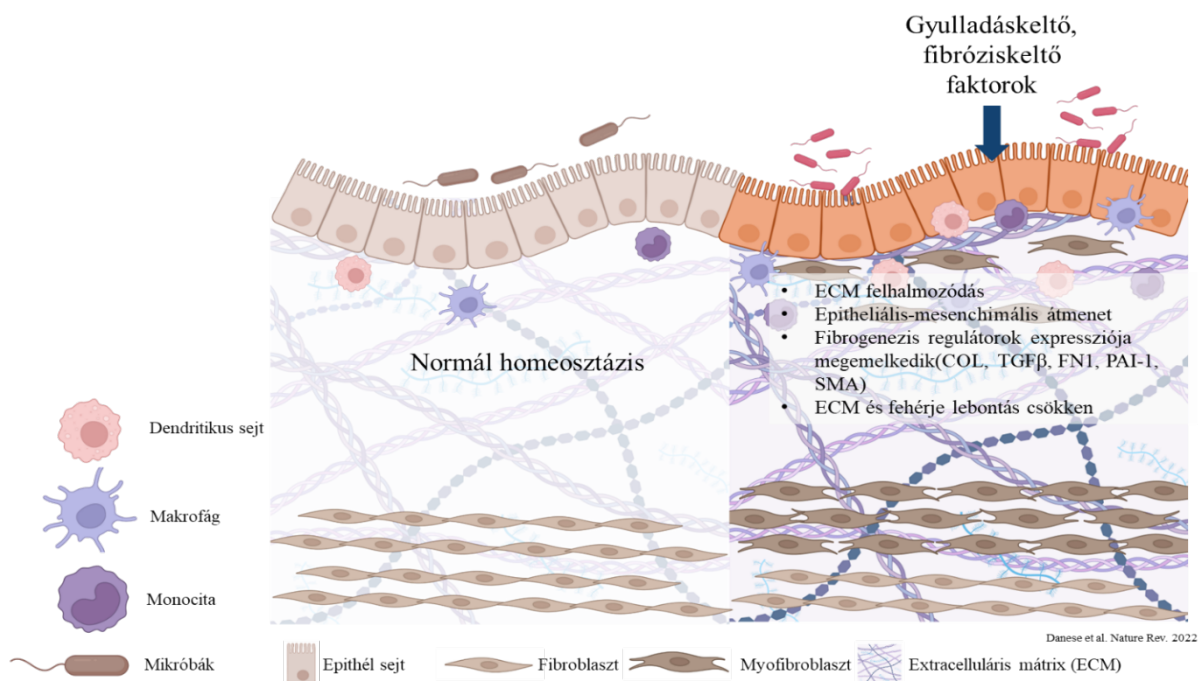
4.4 Fibrózis patomechanizmusa



1. Ábra: A fibrózis kialakulása a gyulladással összefüggésben. (Rieder és mtsai alapján)

Egészséges szervezetben az akut gyulladást regenerációs folyamat követi, a szöveti regeneráció mellett funkcionális gyógyulás is történik. A folyamat önkorlátozó mechanizmus, célja a gyulladás okozta károk helyreállítása. Ezzel szemben patológiás körülmények között az ismétlődő szöveti károsodás miatt a gyógyulás nem következik be megfelelően, a funkcionalitását elveszti a szövet (Rieder & Fiocchi, 2009). Ha a gyulladást sikeresen kezelik, és a gyulladásos mediátorok szintje csökken, viszont a pro-fibrotikus faktorok szintje továbbra is magas marad, ami azt jelzi, hogy a fibrózis progressziójában a gyulladástól független mechanizmusok is szerepet játszhatnak (**1. Ábra**) (Rieder és mtsai., 2024).

A fibrózis egy szisztémás patofiziológiai folyamat, amelyet az extracelluláris mátrix és a sejtösszetétel megváltozása jellemez a bélfal rétegeiben (D'Alessio és mtsai., 2022). Nem önálló betegség, hanem kóros állapot, amely visszatérő sérülésekből és szabályozatlan szövetgyógyulásból ered, különösen krónikus gyulladásos rendellenességek esetén (**2. Ábra**) (Henderson és mtsai., 2020). A fibrózis során a szövetben felhalmozódnak az extracelluláris mátrixot alkotó fehérjék (Derkacz és mtsai., 2021). Kiemelt szerepe van ebben a folyamatban az I és III típusú Kollagéneknek, melyeket a fibrociták szekretálnak (Rieder & Fiocchi, 2009).



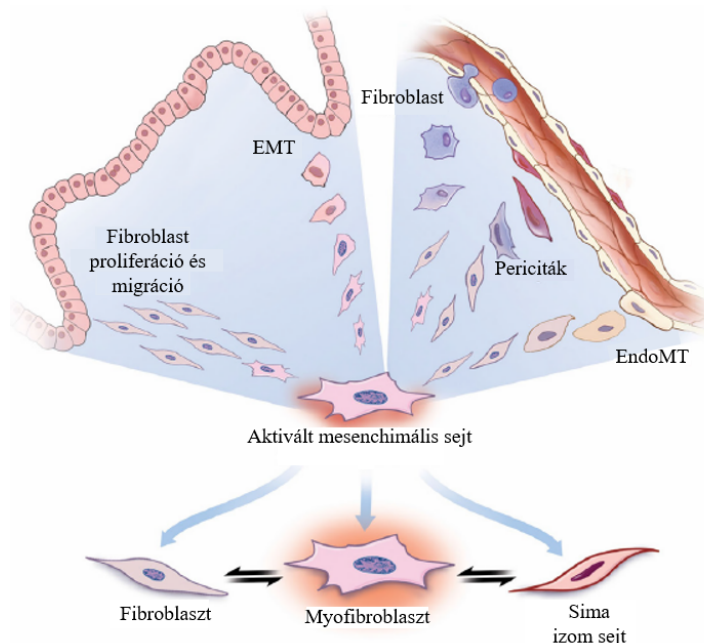
2. Ábra Az intesztinális szövet normál homeosztázisa és a fibrotikus szignálok hatására bekövetkező változások (Danese és mtsi alapján)

A krónikus gyulladás következtében kialakult fibrózis visszafordíthatatlan folyamat. A gyulladáscsökkentő szerek nem enyhítik a fibrózis okozta problémákat, így a kutatások a gyulladástól független mechanizmusokra koncentráltak. A legfontosabb ismert hozzájáruló faktorok a fibrózishoz a szolubilis molekulák, például citokinek és növekedési faktorok, valamint az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) szerepe is jelentős (Park és mtsai., 2023).

4.5 Az IBD és a fibrózis viszonya

Az IBD során a sérült intesztinális epitél sejtek aktiválódnak és az EMT útvonal elindul. Utóbbi folyamat során a specializált epitél sejtek mezenchimális sejtekké alakulnak át és elvesztik funkcióképességüket. Ez a változás kimutatható az epiteliális markerek expressziójának csökkenésével (E-Cadherin) és a mezenchimális markerek (Vimentin, α -SMA) expressziójának jelentős növekedésével (Frid és mtsai., 2002).

Túlzott gyulladásos immunválasz, például hipoxia és másodlagos mechanikai stressz jelenlétében az endotél sejtek aktiválódnak, és fibroblaszt tulajdonságokkal rendelkező sejtekké alakulnak. Ezt endoteliális mezenchimális tranzíciónak (EnMT) nevezik, amelyben a sejtekben expresszált endotél markerek (VE-cadherin) elvesznek, és a fibroblaszt markerek expressziója nő (Park és mtsai., 2023). Ez a felhalmozódás az epitélium funkcióvesztését idézi elő, továbbá a bél keresztmetszetének szűkülete és az intesztinális homeosztázis károsodása is megfigyelhető. Ezek



3. Ábra Az aktivált intesztinális mezenchimális sejtek sejtforrásai és lehetőségük fibroblasztokká, myofibroblasztokká és simaizomsejtekké történő transzdifferentiálódásra. EMT: epiteliális-mezenchimális átmenet; EndoMT: endothel-mezenchimális átmenet. (Illusztráció alapja: Rieder és mtsai.)

együttesen pedig felszívódási zavarokat, illetve bélmotilitási problémákat okoznak (3. Ábra) (Rieder & Fiocchi, 2009).

Egy tanulmány kimutatta, hogy a betegek nagy többségénél kezdetben tisztán a bélfal gyulladása jellemző, de a diagnózistól számított 10 éven belül a betegek több, mint 70%-nál szűkület vagy perforáció alakul ki (Rieder, 2018). Egy populáció alapú longitudinális vizsgálatban, a Crohn-betegségben való bélszűkület valószínűsége 5% volt 90 nap múlva, 7,2% 1 év múlva, 12,4% 5 év elteltével, 15,2% 10 év elteltével és 21,6% 20 év távlatában (Chang és mtsai., 2015). A Crohn-betegségben szenvedő betegek több, mint egyharmada, akiknél kialakul a bél lumenének szűkülése és elzáródása, sebészeti beavatkozáson megy keresztül. Mindazonáltal műtéti beavatkozás nem alkalmas a betegség kiújulásának megelőzésére (Tichansky és mtsai., 2000). A myofibroblasztok nagyon fontosak a betegség manifesztációja során. Képesek összehúzódni és vándorolni, továbbá ECM fehérjéket és növekedési faktorokat termelnek (Gabbiani és mtsai., 1971). A myofibroblasztok rendellenes, tartós aktivációja a fibrózis egyik jellemzője. A myofibroblasztok aktivációját többféle ágens indukálja, köztük a TGF- β (Transzformáló növekedési faktor béta) (Meng és mtsai., 2016), a Kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) (Leask és mtsai., 2002), a Fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) (Akatsu és mtsai., 2019), a gyulladáscitokinek, például a TNF- α (Hou és mtsai., 2018) és az Interleukinek (IL-ek) (Sziksz és mtsai., 2015) is szerepet játszanak.

4.6 A gyulladás következtében kialakuló fibrózis molekuláris mechanizmusa

A gyulladás során felszaporodó immunsejteknek, mint például a T-sejtek, fontos szerepe van a fibroblasztok aktivációjában, osztódásában és a Kollagén termelésében. Korábban megfigyelték, hogy a T-sejtek képesek szabályozni a fibrózt a különböző szövetekben. A T-sejtek szabályozási mechanizmusa a bélsejtekben még nincs jól dokumentálva. Azonban valószínűsíthető a kutatások alapján, hogy a T-sejtek alcsoportjai és expresszált citokinek elősegíthetik a bélfibrózis kialakulását (Y. Wang és mtsai., 2022). Például a Th-2 egy segítő T-sejt, amely többek között Interleukin 13-at (IL-13) termel, mely képes gátolni az MMP-termelést, ami fokozott ECM-lerakódást és indukált TGF- β funkciót idéz elő (Ray és mtsai., 2014). Számos további citokinnek is jelentős szerepe van az intesztinális fibrózis kialakulásában. Például az IL-1 családba tartozó citokinek összefüggésben állnak a myofibroblasztok jelenlétével kolonoszkópiás biopszia mintákban (Sponheim és mtsai., 2010). A gyulladáscitokinek (PDGF-A, PDGF-B, IGF-1, és

Fibronectin) szintén részt vesznek a fibroblaszt osztódásban, továbbá elősegítik ezek gyulladásos területre vándorlását (Park és mtsai., 2023).

A TGF- β -t fehérvérsejtek termelik, gyulladásos markernek tekinthető, emellett kettős funkciója van, egyrészt kompenzálja az epitel sejteket, valamint normalizálja a sejtek homeosztázisát immunfolyamatokon keresztül. Csökkenti az Interleukin-33 (IL-33) expresszióját, CD-s betegekben a TGF- β szintje megnő. Az ECM-hez való kötődés után ezt a komplexet specifikus molekulák, köztük MMP-k, plazmin és integrinek aktiválhatják, ami az aktív TGF- β felszabadulását eredményezi (Rieder és mtsai., 2024). A TGF- β -t a domináns profibrotikus növekedési faktornak tekintik, és lényegében minden fibrotikus betegségben, beleértve a CD-t is, megnövekedett a génexpressziója. A TGF- β serkenti az α -SMA termelést, a Kollagén I és a Fibronectin expressziót a humán fibroblasztokban. Az aktivált TGF β 1 a TGF β 2 receptorokhoz (TGF β -R1 és TGF β -R2) kötődik, és ezt követően további jelátviteli útvonalakat indukál. Így eléri, hogy a fibrózissal kapcsolatos géneket szabályozzák (Lin és mtsai., 2022). A TGF- β központi szerepet játszik számos fibrogén betegségben a fibroblasztok proliferációjának és differenciálódásának indukciója, az ECM-termelés fokozása és az ECM-degradáció gátlása révén (Travis & Sheppard, 2014).

A gyulladásos immunválaszban jelentős szerepet játszó fehérje az 1-es típusú Plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1). Az endotél sejtek termelik és kulcsfontosságú szerepe van a különböző gyulladásos mediátorok szabályozásában a mukóza réteg sérülése során (Kaiko és mtsai., 2019). A PAI-1-et kódoló gén a SERPINE1, mely fokozottan expresszálódik aktív IBD-s betegeknél, kifejezetten azoknál, akik nem reagálnak a TNF- α -t gátló terápiára (Kaiko és mtsai., 2019). Mindemelett csoportunk korábban megfigyelte, hogy az aktív IBD-s betegek szövet, szérum és széklet mintáiban emelkedett a PAI-1 fehérje koncentrációja, mely hatásos terápiát követően lecsökken (Jóárt és mtsai., 2023).

Továbbá a PAI-1 aktiválja a NF- κ B útvonalat neutrofil-mediált kemokin termeléssel és ezzel befolyásolja a bélmikrobiom funkcionalitását (X. Wang és mtsai., 2023). Ezek alapján a PAI-1 szerepe jelentős lehet az IBD patomechanizmusában.

4.7 A fibrózis kezelési stratégiák

A Tumor nekrosis faktor (TNF) egy több sejttípus által termelt gyulladásos citokin, amely serkenti a fibroblasztok proliferációját, modulálja a sejt-kemotaxist és fokozza a fibrogenézist (Nguyen és

mtsai., 2015). Az IBD okozta krónikus gyulladás jelenleg leghatékonyabb kezelése az anti-TNF antitestek alkalmazása (Kaser és mtsai., 2010).

Az immunválaszt és a gyulladást közvetlenül befolyásoló gyógyszerek, mint például a TNF-gátlók és az IL-modulátorok, elsősorban a bélfibrozis korai szakaszában hatnak megelőző kezelések céljából, mivel a gyulladás valószínűleg a bélfibrozis fő kiváltója (J. Wang és mtsai., 2021). Az IBD kezelésére használt egyéb standard gyógyszerek, például a szalicilátok, az antibiotikumok, a szteroidok és az immunszuppresszív vegyületek csökkentik a gyulladásos tüneteket, de nem javítják a fibroszenózisos obstrukciót (Lu és mtsai., 2020).

Nehéz klinikai döntést hozni arról, hogy a fibrózissal járó IBD-ben szenvedő beteg műtétre szorul-e, vagy maradjon-e gyógykezelésen, és gyakran multidiszciplináris csapat értékelését igényli (D'Alessio és mtsai., 2022).

A területen elért előrehaladás ellenére az új, bélrendszerben alkalmazott anti-fibrotikus gyógyszerekkel végzett kísérletek két fő ok miatt késnek: (1) a legutóbbi kísérleti eredményeket nem tudják új gyógyszerekké alakítani, és (2) nincs konszenzus a definíciókkal és a klinikai vizsgálatok végpontjaival kapcsolatban (Rieder és mtsai., 2024).

4.8 Jövőbeli, kísérleti gyógyszerjelöltek a fibrózis kezelésére

A TGF- β profibrotikus hatást fejt ki a myofibroblaszt sejteken, beleértve a sejtaktivációt, a proliferációt, a migrációt és az ECM-termelés fokozását (Valatas, 2017). Ennek következtében indukálja a fibrózis manifesztációját az EMT és az EndoMT (Meng és mtsai., 2016) elősegítésével. A TGF- β -et célzó gátlás *in vivo* javította a bélfibrozist krónikus vastagbélgyulladás modellben. (Ma és mtsai., 2010) A TGF- β génnek az egér vastagbélébe való átvitele obstruktív bélfibrozist eredményezett (Vallance és mtsai., 2005). A dextrán-szulfát-nátrium (DSS) által indukált egér colitis modellben a pirfenidon orális adagolásával csökkent kollagénlerakódás volt megfigyelhető. A pirfenidon gátolta az intesztinális fibroblasztok proliferációját, valamint a differenciálódását is (Li és mtsai., 2016).

4.9 A fibrózis kutatására alkalmazott modellek

A fibrózis modellezése *in vivo*, illetve *in vitro* elengedhetetlen a folyamat patomechanizmusának megértéséhez, új gyógyszer-célpontok azonosításához. A két legelterjedtebb *in vivo* egér modell a

DSS és a TNBS (2,4,6-trinitrobenzán szulfonsav) indukált colitis modellek (Lee és mtsai., 2023). Ezekben megfigyelhető a krónikus gyulladás következtében kialakuló intesztinális fibrózis progressziója. Azonban a fibrózis meglehetősen heterogén, a kísérletek költségesek és időigényesek. Mindemelett a fibrózis komplexitása nem tanulmányozható ezekben az esetekben. Emellett az állatmodellekben a betegség eltér a humán megfelelőjétől, valamint nem alkalmas nagy számú teszt (például gyógyszerjelöltek) kivitelezésére (Baydi és mtsai., 2021).

Ezzel szemben az *in vitro* modellek költséghatékonyak és nagy áteresztéssel vizsgálhatóak a potenciális gyógyszerjelöltek. A bélfibrózis korábbi *in vitro* modelljei a myofibroblasztra, a fibrózis kulcsfontosságú effektorsejtjére összpontosítottak, fibrinogén citokin stimulációt (pl. TGF- β) és mechanikai stresszt (pl. mátrix merevsége) alkalmazva. Ezekhez a vizsgálatokhoz elsősorban immortalizált sejtvonalakat alkalmaznak (Rodansky és mtsai., 2015).

Az IBD esetében nem áll rendelkezésre releváns primer humán modell a fibrózis modellezésére *in vitro* körülmények között. Bár a humán vastagbél organoid kultúrák tartalmazhatnak myofibroblaszt sejteket (Rodansky és mtsai., 2015), továbbra sem ad tökéletes megoldást a fibrózis mechanizmusának megfigyelésére.

5 Célkitűzések

Mivel jelenleg nem elérhető hatékony anti-fibrotikus terápia a klinikumban és nincs *in vitro* primer humán intesztinális fibroblaszt sejtkultúra modell, ezért kutatásunk során célul tűztük ki kontroll és IBD-s eredetű primer fibroblaszt sejtkultúra létrehozásának optimalizálását és annak fenntartását a harmadik passzálásig.

Mindemellett, további célunk volt, hogy karakterizáljuk a sejtkultúra fibrózisra jellemző fenotípusát és genotípusát, valamint összehasonlítsuk a két vizsgált csoportot.

6 Módszerek bemutatása

6.1 Primer humán fibroblaszt sejtkultúra létrehozása és fenntartása

A kolonoszkópiás vizsgálat során levett biopszias minták gyűjtésében és a betegadatok értékelésében az SZTE-SZAOK Belgyógyászati Klinika munkatársai segítettek. A vizsgálat során összesen 4 kontroll és 4 beteg mintát **(1. Táblázat)** használtunk fel (etikai engedély száma: NNGYK/14579-5/2024).

Betegadatok	Kontroll	Crohn-beteg
Beteg száma (N)	4	4
Nemek aránya (nő:férfi)	2:2	1:3
Életkor (év)	45.25	40.75

1. Táblázat: A vizsgálatba bevont betegek adatai.

A szövetmintákat Colon WASH médiumban **(2. Táblázat)** szállítottuk a laboratóriumunkba. A biopsziákat háromszor megmostuk Colon WASH médiummal. A mosás után a szövetet egy 6 cm-es Petri-csészébe helyeztük, majd steril borotvapenge segítségével a mintát apróra vágtuk. Ezt követően 3 ml Digestion oldattal **(3. Táblázat)** 30 ml-es centrifugacsőbe (Greiner, 201170) helyeztük a szövetdarabokat enzimatis emésztési lépéshez. További 2 ml Digestion oldattal a csészét átmostuk és ezt is hozzáadtuk. A csövet 30 percig 37°C-ra állított síkrázóban inkubáltuk, ezután összeráztuk, majd további 15 percig ráztattuk, hogy minél hatásosabb legyen az emésztés. Ezt követően 15ml-es centrifuga csőbe helyeztük a sejteket tartalmazó oldatot és mosási lépést végeztünk, amely során 3 ml Colon WASH médiummal mostuk a pelletet és centrifugával ülepítettük őket (1000 rpm, 4 °C, 5 perc, Eppendorf, 5804 R), majd a felülúszót eltávolítottuk, ezt a folyamatot 5 alkalommal ismételtük meg. Az utolsó mosás lépés után a felülúszót teljesen eltávolítottuk, a sejtpelletet pedig 4 ml fibroblaszt táp médiumban **(4. Táblázat)** szuszpendáltuk össze és 6 cm-es Petri-csészében eloszlattuk. Másnapra sejtek letapadnak, a sejtenyésző edény alján osztódásnak indulnak. A táp oldatot lecseréltük, hogy a le nem tapadt sejtörmeléket eltávolítsuk. Naponta monitoroztuk növekedésüket fénymikroszkóp segítségével (Zeiss, Primovert), 90% konfluencia elérésekor passzáltuk őket.

Colon Wash médium 50 ml		
Komponens	Gyártó, kat.szám	Térfogat
Splitting médium*	-	47,25 ml
FBS	Gibco, A5256801	1,25 ml
Kanamycin	Gibco, 15160047	0,5 ml
Antibiotikum-antimikotikum	Gibco, 15240062	0,5 ml
Gentamycin	Gibco, 15750060	50 µl
Vorikonazol 10 mg/ml	Tocris, 3760/100	5 µl

2. Táblázat: A Colon Wash médium összetétele, melyet a szövet mosására alkalmaztunk.

Digestion médium 10 ml		
Komponens	Gyártó, kat.szám	Térfogat
Splitting médium*	-	9,45 ml
FBS	Gibco, A5256801	250 µl
Kanamycin	Gibco, 15160047	100 µl
Antibiotikum-antimikotikum	Gibco, 15240062	100 µl
Gentamycin	Gibco, 15750060	10 µl
Vorikonazol 10 mg/ml	Tocris, 3760/100	1 µl
Kollagenáz IV	Gibco, 17104019	45 µg
Diszpáz II	Sigma, D4693-1G	10 µg

3. Táblázat: A Digestion médium összetétele, amelyet a szövet enzematikus emésztéséhez alkalmaztunk.

Fibroblaszt táp médium 50 ml		
Komponens	Gyártó, kat.szám	Térfogat
DMEM F12/Ham	Sigma, D6421	41,5 ml
FBS	Gibco, A5256801	7,5 ml
Kanamycin	Gibco, 15160047	0,5 ml
Antibiotikum-antimikotikum	Gibco, 15240062	0,5 ml
Gentamycin	Gibco, 15750060	50 µl
Vorikonazol 10 mg/ml	Tocris, 3760/100	5 µl

4. Táblázat: A Fibroblaszt táp médium összetétele

A passzálás során először a fibroblaszt táp médiumot eltávolítottuk, majd 5 ml DPBS-el (Gibco, 14190250) megmostuk a kultúrát három alkalommal. Ezt követően 2 ml tömény TrypLE™ Express (Gibco, 12605-028) emésztő oldatot helyeztünk rá és oszlattunk el rajta, majd 37°C-os inkubátorba helyeztük 7 percre. Az idő elteltével a Petri-csésze oldalát óvatosan ütögetve

segítettük, hogy a letapadt sejtek felváljanak az edény aljáról. A sejteket az oldattal együtt pipettával lefűjtük a csésze aljáról és egy 15 ml-es centrifugacsőbe gyűjtöttük. A csészét átmostuk Colon WASH médiummal, majd a sejtszuszpenzióhoz adtuk. Centrifuga segítségével leüleptítettük a sejteket (5 perc, 4°C, 1000 rpm). A felülúszót eltávolítottuk, még három mosási lépést végeztünk 3 ml Colon WASH médiummal. Ezután a sejtpelletet fibroblaszt táp médiumban felvettük és egy új sejtenyésző edényben szélesztettük ki.

A passzálások során a sejtek egy részét fagyasztó médiumba (**5. Táblázat**) helyeztük és Mr. Frosty (Nalgene, 5100-0001) segítségével lefagyasztottuk, majd folyékony nitrogénben tároltuk további vizsgálatokhoz.

Fagyasztó médium		
Komponens	Gyártó, kat.szám	Arány
Fibroblaszt táp médium	-	55 %
FBS	Gibco, A5256801	40 %
DMSO	Sigma, D5879-1L	5 %

5. Táblázat: A fagyasztó médium összetétele, melyben a sejteket későbbi vizsgálatokhoz fagyasztva tároljuk.

6.2 Immunfluoreszcens festés

A fibrózisra jellemző fenotípus vizsgálatára immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. A passzálás során a sejtek egy részét üveglemezre növesztettük, majd 4% paraformaldehid (Thermo Scientific, 043368.9M)/PBS (Sigma, P4417-100TAB) 20 percig fixáltuk a mintákat. A fedőlemezen fixált sejteket PBS oldattal mostuk, majd 0,1% Triton X 100 (Sigma, X100-100ML)/PBS oldattal végeztük a sejtek permeabilizálását 10 percig, szobahőmérsékleten. Ezt követően ismét PBS oldattal mostunk, három alkalommal. A blokkolási lépést 10% BSA (SERVA, 11924-04)/PBS oldattal végeztük 2 órán keresztül, 37°C-on inkubálva. Ezt követően a vizsgált fehérjék detektálására specifikus elsődleges antitesteket vittünk fel a mintákra és 4°C-on inkubáltuk, egy éjszakán keresztül, nedves környezetben. Az alkalmazott antitesteket a **6. Táblázat** foglalja össze. Ezután 3 alkalommal mostuk a mintákat PBS oldattal, majd specifikus kecske anti-egér IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, A11001) és kecske anti-nyúl IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, A11034) másodlagos antitesteket alkalmaztunk. Emellett Alexa Fluor 594-gyel konjugáltatott Phalloidin-t (Abcam, ab176757) használtunk az aktin filamentumok jelölésére. Az antitesteket 10% BSA/PBS-ben 1:2000 arányban hígítottuk és 2 órán keresztül,

szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk. Ismét 3 alkalommal mostunk PBS oldattal, majd Hoechst (Thermo Scientific, 62249) festést alkalmaztunk 1:2000 arányban, PBS-ben hígítva, a sejtmagok megjelölésére, 20 percig szobahőn, fénytől védve. Végül ismét három alkalommal mostunk PBS oldattal és mounting médiummal (Sigma, F4680-25ML) tárgylemezeken fedtük a sejteket. A képalkotáshoz Leica Stellaris konfokális fluoreszcens mikroszkópot használtunk, a fluoreszcens intenzitás méréséhez ImageJ szoftvert alkalmaztunk.

Név	Klonalitás	Hígítási arány	Gyártó	Kat.szám
α -SMA	nyúl monoklonális	1:200	Cell Signaling Technology	19245
TGF- β	nyúl poliklonális	1:200	Bioss	bs-0086R
PAI-1	egér monoklonális	1:200	Invitrogen	MA1-40224
Foszfohisztón H3	nyúl poliklonális	1:100	Merck	06-570
COL1A1	nyúl poliklonális	1:100	Invitrogen	PA5-29569

6. Táblázat: Az immunfluoreszcens festésekhez alkalmazott antitestek

6.3 Génexpressziós vizsgálatokhoz alkalmazott módszerek

6.3.1 RNS izolálás

A génexpressziós vizsgálatokhoz a sejtek egy részéből RNS-t izoláltunk NucleoSpin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel, 740984.250) használatával. A lépéseket a kit-hez tartozó, gyártó által javasolt protokoll alapján végeztük el. Az izolálás után az RNS koncentrációját NanoDrop One (Thermo Scientific) spektrofotométerrel határoztuk meg. A kísérletek során felhasznált RNS minták koncentrációit az **7. Táblázat** foglalja össze.

Csoport	Minta ID	Koncentráció (ng/ μ l)
Kontrol	461	517.1
	465	922.1
	466	530
	467	442.9
Crohn-betegség	451	1166.6
	454	125.6
	464	452.6
	468	196

7. Táblázat: Az izolált RNS minták koncentrációja NanoDrop spektrofotométerrel mérve.

6.3.2 Reverz transzkripció cDNS létrehozásához

A génexpressziós vizsgálatokhoz az RNS izolálást követően a reverz transzkripciót végeztünk el, hogy a későbbiekben a cDNS-sel dolgozzunk tovább. Ehhez iScript cDNA Synthesis Kit-et (Bio-

Rad, 1708890) használtunk, a reakciókat a mellékelt protokoll alapján végeztük el. Minden cDNS mintát 50 ng/μl-es koncentrációban alkalmaztunk.

6.3.3 Primer tervezés és vég-pont analízis PCR

A kísérletekhez felhasznált primereket NCBI-Primer Blast oldal segítségével terveztük meg (**8. Táblázat**). Mindegyik primerpár maximum 200 bázispár hosszú PCR terméket ad, olvadási hőmérséklete 58°C és exon-exon kapcsolódási pontokra lettek megtervezve. Utóbbival növelni lehet a primerek specifikusságát és az eredmények pontosságát. Végpont analízis PCR-t végzünk, hogy megfigyeljük specifikusak-e a primerek az adott génre és használhatóak-e a későbbi qRT-PCR vizsgálathoz. Egy reakció összetételét és a PCR programot az **9. és 10. Táblázat** foglalja össze.

Gén neve	Fwd/Rev 5'→3'	T _m (°C)	Termék (bp)
RPS23	CGTGCTGGAAAAAGTAGGAGT	58.23	175
	TTTGCGACCAAATCCAGCAA	58.96	
COL1A1	CAAGACGAAGACATCCCACCA	60.00	126
	GTCATCGCACAAACACCTTGC	60.39	
ACTA2	CCATCATGCGTCTGGATCTG	58.49	102
	TCTCACGCTCAGCAGTAGTA	57.89	
TGF-β1	GGAAATTGAGGGCTTTCGCC	59.83	90
	CCGGTAGTGAACCCGTTGAT	59.75	
FN1	GTCCGGGACTCAATCCAAATG	58.98	52
	TCCAGGAACCCTGAACTGTAAG	59.36	
PAI-1	ACCTCTGAGAACTTCAGGATGC	59.76	195
	GGGTGAGAAAACCACGTTGC	59.97	
H3C4/2	GAATCATGTCTGGTCGCGG	58.70	114
	GGCGAATAGCCGGTTTTGTA	58.63	

8. Táblázat: Az NCBI Preimer Blast programmal tervezett primerek szekvenciája, olvadási hőmérséklete és a PCR termékének hossza

Komponens	Kat.szám, Gyártó	Térfogat (μl)
dNTP	R012, Thermo Scientific	2
Green puffer	EP1713, Thermo Scientific	2
Taq polimeráz	EP1713, Thermo Scientific	0.5
cDNS	-	1
Víz	BE51200, Lonza	12.5
Forward primer	-	1
Reverz primer	-	1

9. Táblázat: A végpont-analízis PCR-hoz használt reakció összetétel

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő	Ciklus
Pre-denaturáció	95°C	1 perc	-
Denaturáció	95°C	30 mp	40
Anealing/hibridizáció	58°C	30 mp	
Polimerizáció	72°C	14 mp	
Inkuibáció	4°C		-

10. Táblázat: A végpont-analízis PCR-hoz használt protokoll

Komponens	Kat.szám, Gyártó	Térfogat (ul)
SYBR Green	Bio-Rad, 1725247	5
ROX	Bio-Rad, 1725858	0.2
Víz	Lonza, BE51200	3.3
cDNS	-	0.5
Forward primer	-	0.5
Reverz primer	-	0.5

11. Táblázat: A kvantitatív valós idejű PCR-hoz alkalmazott reakció összetétele

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk meg 90 V-on, 1 órán keresztül és 1 kb plus DNA létrát (Invitrogen, SM331) használtunk, hogy meghatározzuk a PCR termékek hosszúságát. A detekcióhoz Bio-Rad GelDoc-ot és Safe Red-et alkalmaztunk.

6.3.4 Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

A génexpressziós változások vizsgálatához kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakciót alkalmaztunk (qRT-PCR). A reakcióhoz SYBR Green Master Mixet (Bio-Rad, 1725274) használtunk fel. Háztartási génnek az RPS23-at alkalmaztuk. 96 lyukú plate-re (Thermo Scientific, 4346907) mértük a reakció mixeket, a vizsgálni kívánt génhez három párhuzamos mérést és egy

templát nélküli kontrollt készítettünk. A reakció komponenseit, valamint egy reakcióra számolt mennyiségét a **11. Táblázat** foglalja össze. A relatív génexpressziós változás meghatározásához a Livak-metodikát alkalmaztuk. A kísérleteket Thermo Scientific QuantStudio 3 qRT-PCR géppel végeztük.

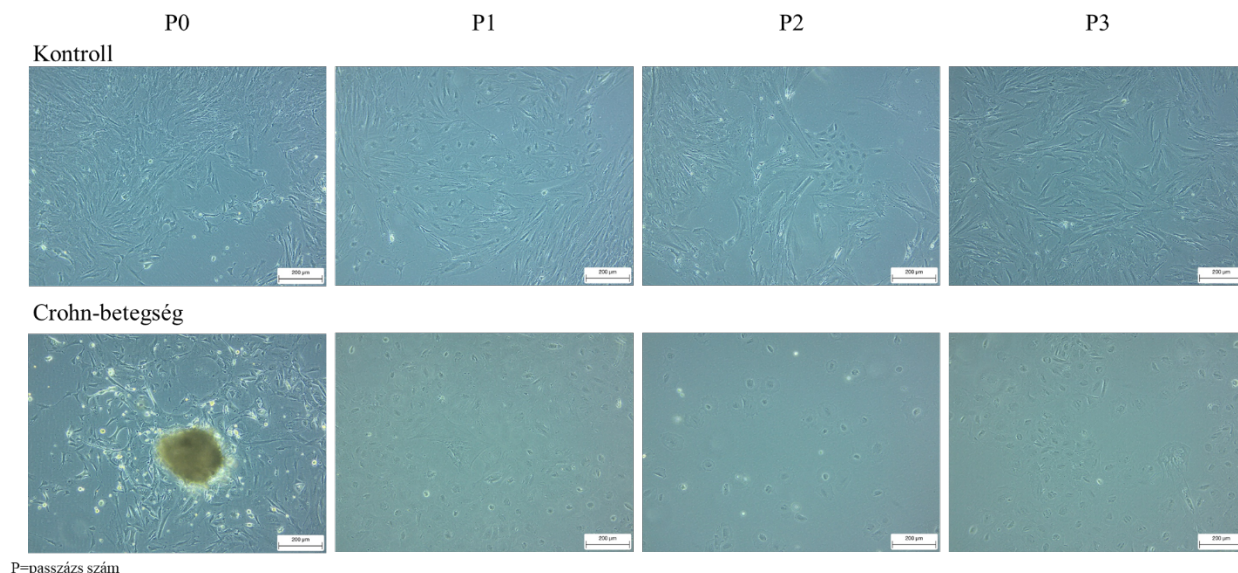
6.4 Statisztikai elemzés

Az immunfluoreszcens festések, illetve a qRT-PCR mérés alatt begyűjtött adatokat a GraphPad szoftverrel analizáltuk. A normál eloszlás vizsgálatához a Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztuk. Majd páratlan T-próbával vizsgáltuk Welch-féle korrekcióval a kontroll és Crohn-beteg csoportok közötti mért adatok eltérését. Szignifikanciát $p < 0,05$ esetén fogadtuk el.

7 Eredmények

7.1 Primer humán intesztinális fibroblaszt sejtkultúra létrehozásának és fenntartásának optimalizálása

Vizsgálataink során hatékonyan tudtunk primer humán vastagbél fibroblaszt sejtkultúrákat létrehozni és fenntartani egészséges és beteg eredetű vastagbél biopsziákból is. A sejtek az izolálás után letapadtak a sejtenyésző edény aljára, majd ott osztódásnak indultak. Megfelelő konfluencia elérésekor a sejtkultúrát passzálassal vittük tovább egy nagyobb sejtenyésző edénybe, a passzási módszer is sikeres volt. A kultúrákat a 3. passzázig tartottuk fent, ami nagyjából egy hónapot jelentett, ekkor használtuk fel a kísérletekhez (**4. Ábra**). A fenntartásuk alatt folyamatosan monitoroztuk őket fénymikroszkóp alatt és morfológiai különbségeket tudtunk megfigyelni a kontroll és a beteg fibroblaszt sejtkultúrák között. A Crohn-beteg mintákból származó sejtkultúrák esetén eltérő, különböző morfológiai jellegzetességek voltak megfigyelhetőek, míg a kontroll kultúrák esetén a sejtek egységesen megnyúlt alakot mutattak. A beteg kultúrák esetében következtethetünk arra, hogy eltérő szubtípusokhoz tartozó sejtekből állt össze a tenyészet, ezt további vizsgálatokkal lehet igazolni.



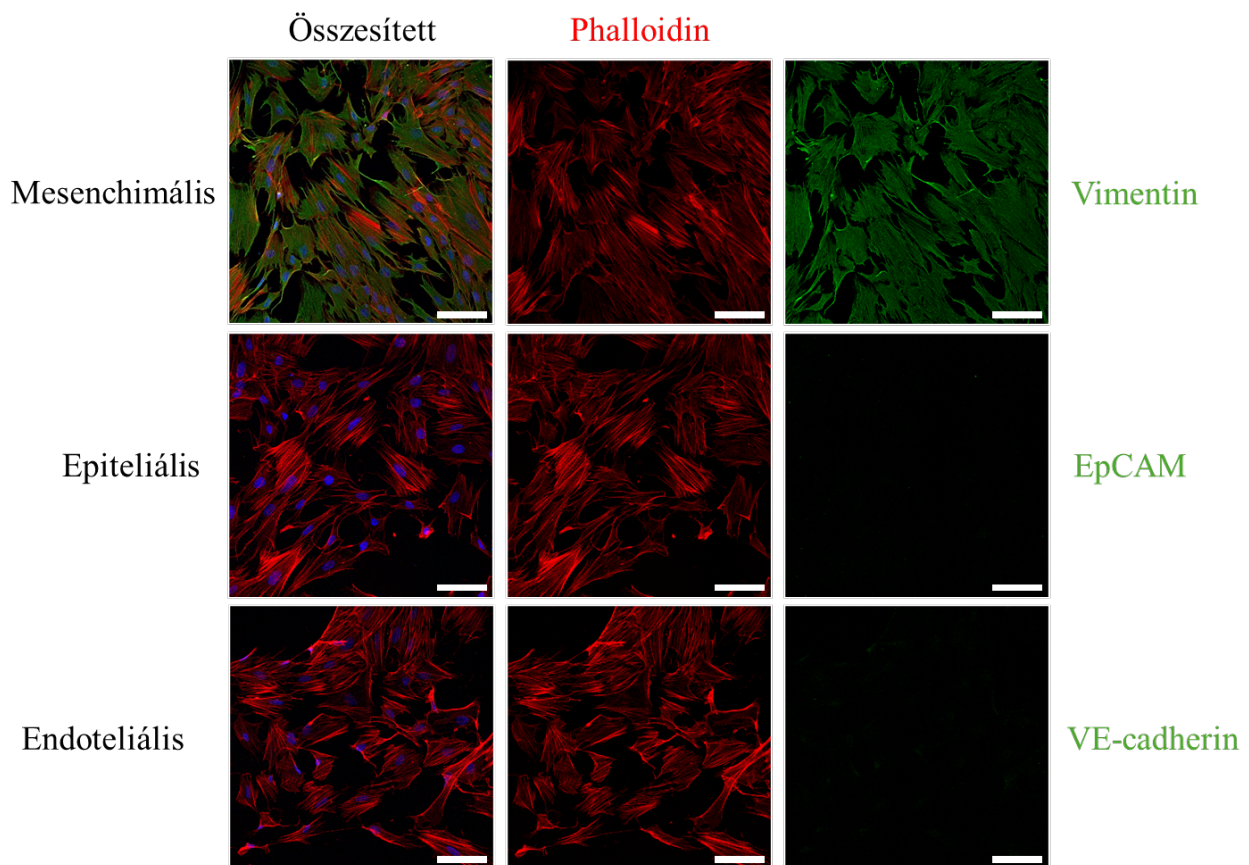
P=passzázs szám

4. Ábra: A primer humán fibroblaszt sejtkultúrák fénymikroszkópos képei, felül: kontroll, alul: Crohn-beteg, 1-3. passzázs.
Lépték: 500 µm

7.2 A sejtkultúra mezenchimális eredetének igazolása

A fibroblaszt sejtkultúra létrehozásának optimalizását követően, megvizsgáltuk annak mezenchimális eredetét, melyhez 3 sejttypus markert jelöltünk meg immunfluoreszcens festési

módszer segítségével. A Vimentint, ami egy mezenchimális marker, a 3-as típusú intermedier filamenteket jelöli, amelyek a mezenchimára jellemző struktúr fehérjék. Az EpCAM (Epiteliális sejtadhéziós molekula) festés a hámsejteket (epitél sejtek) különbözteti meg, ugyanis az epitéliumra jellemző Ca^{2+} függő transzmembrán glikoproteineket jelöli meg. Míg a VE-cadherin (Vaszkuláris endoteliális kadherin) festés az endoteliális eredetű sejteket jelöli a Ca^{2+} függő sejt-sejt adhéziós molekula jelölése által. Az immunfluoreszcens festés bizonyította a sejt kultúra mezenchimális eredetét, a Vimentin fluoreszcens intenzitása erőteljes, míg a másik két célponté nem volt detektálható (5. Ábra).

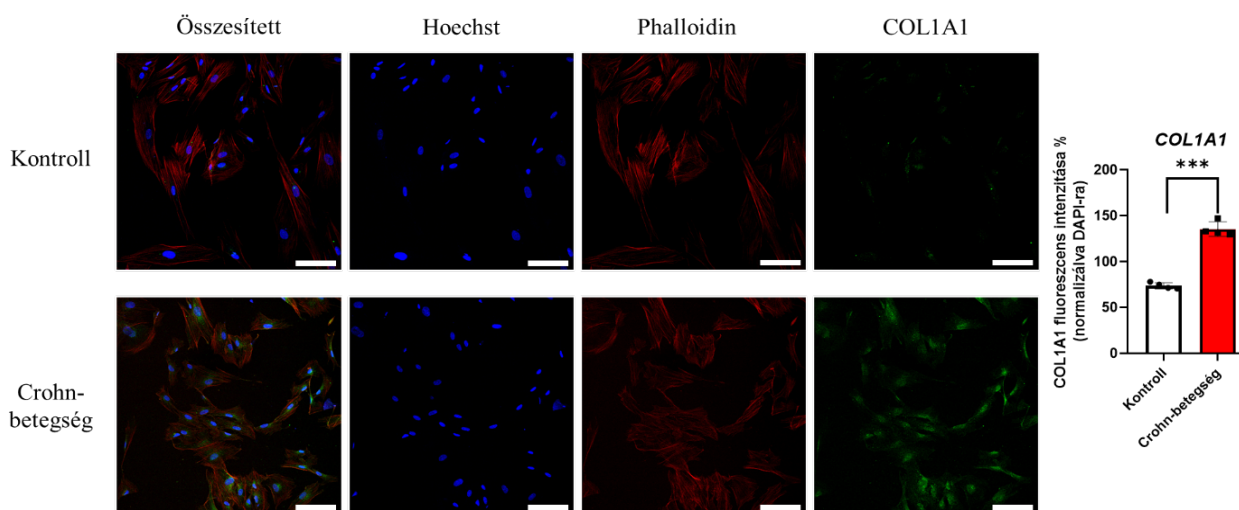


5. Ábra : Immunfluoreszcens festés a sejt kultúra mezenchimális eredetének igazolására. Fentről: Vimentin, EpCAM, VE-cadherin célpontok. A festés alátámasztotta, hogy a kultúrák fibroblasztokat tartalmaznak. A Phalloidin az aktin filamentumokat jelöli, a sejtek struktúráját mutatja. Kék: Hoechst (sejtmag), Piros: Phalloidin, Zöld: Vimentin, EpCam, VE-cadherin. Lépték: 100 μm .

7.3 Primer humán fibroblaszt sejt kultúra fibrotikus fenotípusának vizsgálata

Ezt követően a fibrózisra jellemző fenotípus jelenlétét vizsgáltuk a sejtekben, a kiválasztott fibrotikus markerek immunfluoreszcens festése szintén sikeres volt a korábban optimalizált protokoll alapján.

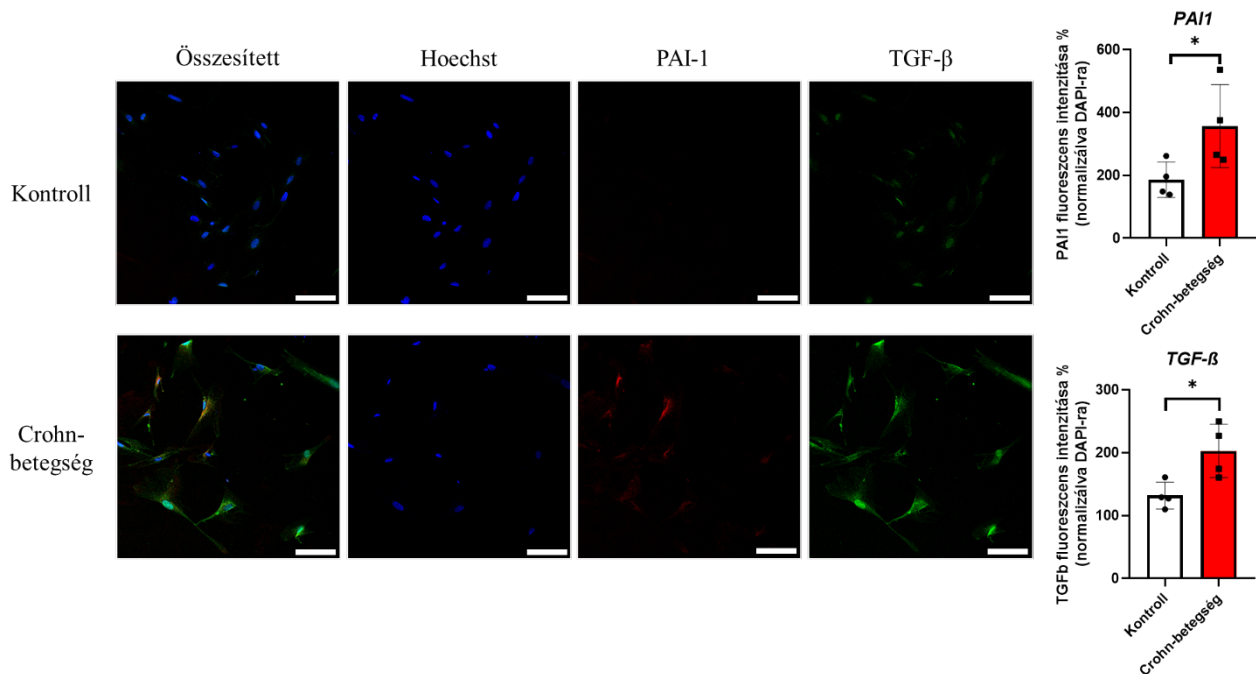
A festéskor a fibrotikus markerek fluoreszcens intenzitása szignifikánsan magasabb volt az IBD-s eredetű fibroblaszt sejtkultúrában, a kontrollhoz viszonyítva. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy fehérje szinten a fibroblasztok megtartották a fibrózist definiáló fehérje mintázatot.



6. Ábra: A COL1A1 immunfluoreszcens festése. A beteg minta fluoreszcens intenzitása szignifikánsan magasabb a kontroll csoportéhoz képest. . Kék: Hoechst (sejtmag), piros: Phalloidin, zöld: COL1A1. Lépték: 100 μ m. *** $p < 0,001$, páratlan t próba

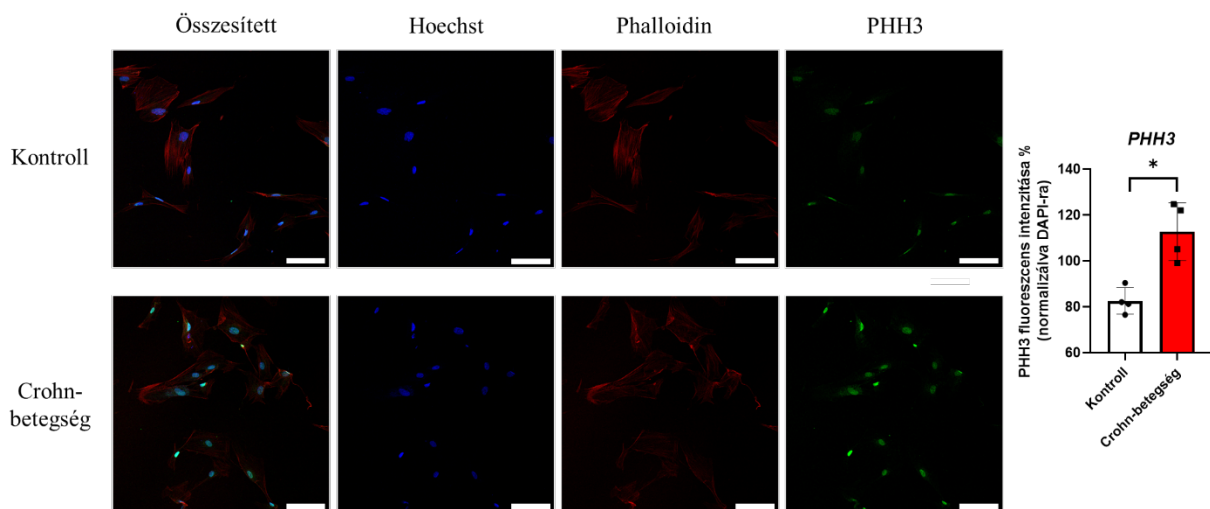
A COL1A1 felhalmozódik az extracelluláris mátrixban, így egy fontos fibrotikus markernek tekinthető. A COL1A1 a sejtmagok körül lokalizálódott. (6. Ábra)

A TGF- β egy univerzális gyulladásos marker, ami a fibrózisban jelentős, serkenti a Kollagén és Fibronectin kiválasztását a fibroblaszt sejteknek, valamint hozzájárul az α -SMA termelés felszabályozásához. A PAI-1 szintén a gyulladásos válaszban résztvevő citokin, és szoros összefüggésben áll a TGF- β által közvetett szignalizációs útvonallal. Mindemellett más faktorokkal kölcsönhatásban elősegíti a fibrotikus folyamatot progresszióját. Vizsgálatunk során a TGF- β és PAI-1 fluoreszcens intenzitása szignifikánsan magasabb volt a IBD-s betegek mintáiból létrehozott fibroblaszt sejtkultúrákban (7. Ábra). Eredményeink alapján mind a két vizsgált fehérje a citoplazmatikus lokalizációt mutatott, de a TGF- β esetén a sejtmagban is kaptunk pozitív jelet.



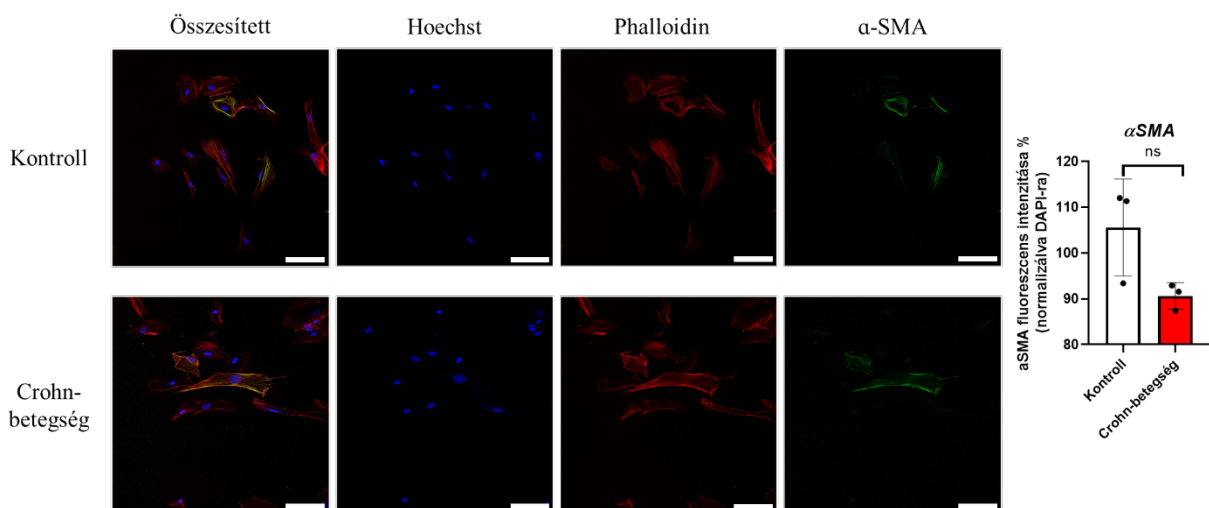
7. Ábra : A PAI-1 és a TGF- β fibrotikus markerek immunfluoreszcens festése, Mindkét esetben a beteg minta fluoreszcens intenzitása szignifikánsabban magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Kék: Hoechst (sejtmag), piros: PAI-1, zöld: TGF- β . Lépték: 100 μ m. * $p < 0,05$, páratlan t próba

A Foszfohiszton H3 (PHH3) mitózis marker szignifikánsan magasabb fluoreszcens intenzitást mutatott a beteg fibroblaszton, ami arra utal, hogy ez a csoport erősebb proliferációs rátával rendelkezik. A PHH3 a sejtmagban lokalizálódott a festéseink során. (8. Ábra)



8. Ábra A PHH3 (foszfohiszton H3) proliferációs marker immunfluoreszcens festése. A beteg kultúra fluoreszcens intenzitása szignifikánsabban magasabb volt a kontroll csoportnál. . Kék: Hoechst (sejtmag), piros: Phalloidin, zöld: PHH3. Lépték: 100 μ m. * $p < 0,05$, páratlan t próba

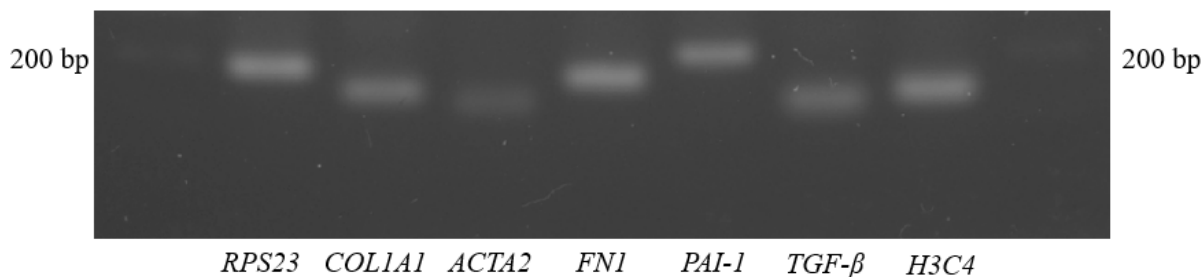
Mindazonáltal a myofibroblast marker, az α -SMA nem mutatott szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között. (9. Ábra)



9. Ábra : Az α -SMA myofibroblaszt marker immunfluoreszcens festése. A két csoport fluoreszcens intenzitása között nem volt szignifikáns különbség megfigyelhető. Kék: Hoechst (sejtmag), piros: Phalloidin, zöld: α -SMA. Lépték: 100 μ m. ns: nem szignifikáns, páratlan t próba

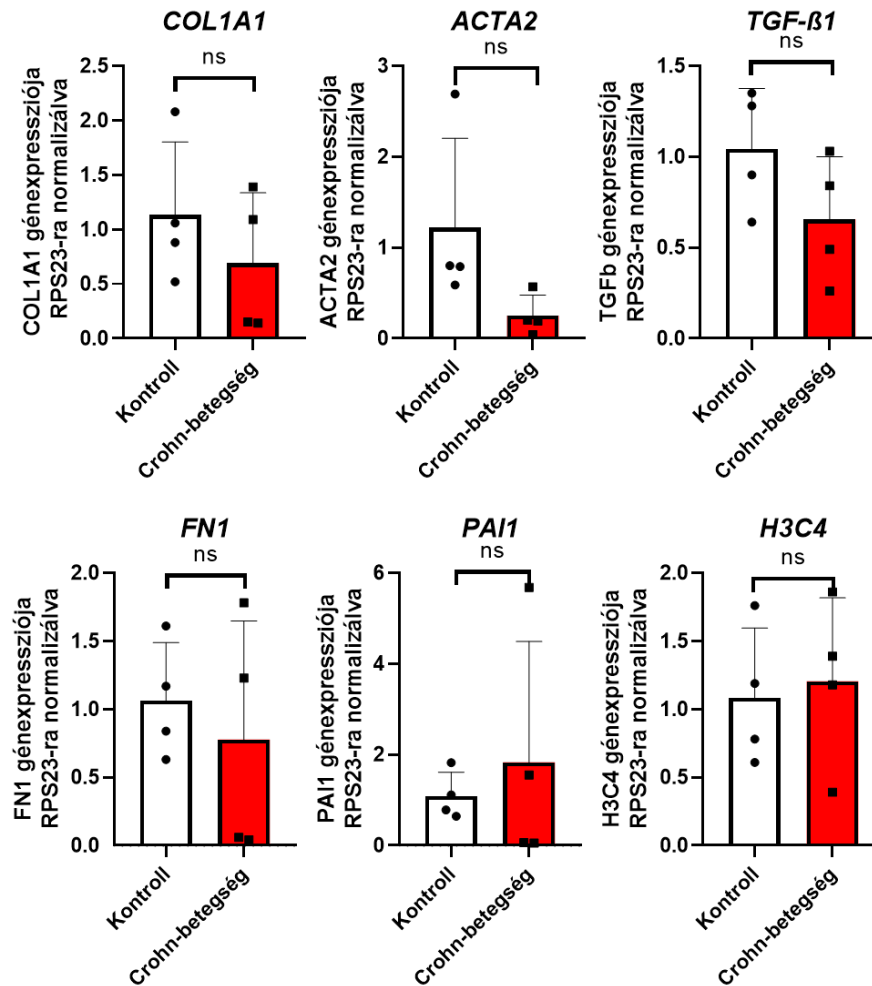
7.4 A primer humán vastagbél sejt kultúrák fibrózisos génexpresszió analízise

A génexpressziós vizsgálataink során minden tervezett primer alkalmazhatónak bizonyult. Az agaróz gélen megfuttatott PCR termékek minden esetben csak egy „band”-et mutattak, ebből arra következtethetünk, hogy csak a cél génhez kötődtek a primerek (10. Ábra). A kutatásunk során létrehozott összes fibroblaszt sejt kultúrából sikeresen izoláltunk RNS-t (7. Táblázat), amelyekből később reverz transzkripció segítségével cDNS-t készítettünk.



10. Ábra : A primer teszt végpont-analízis PCR gélelektroforézis képe. Minden tervezett primer specifikus a génekre.

A mintáinkból elvégeztük a qRT-PCR méréseket, azonban a vizsgált génekben nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között (11. Ábra).



11.Ábra. A génexpressziós változás vizsgálata a kontroll és IBD-s eredetű primer humán fibroblaszt sejtkultúrában.
ns: nem szignifikáns, páratlan t próba

8 Diszkusszió

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) az egyik legjobban kutatott krónikus, immun-mediált betegségek közé tartozik. Európában több, mint 3 millió, hazánkban közel 50000 regisztrált beteg él az IBD valamely kórképével és rohamosan nő a fiatal korban diagnosztizált betegek száma. A betegségre jellemző, hogy a nyugalmi és fellángoló időszakok váltják egymást (Kaser és mtsai., 2010). A tünetek enyhítésére számos gyógyszeres kezelés áll rendelkezésre, azonban definitív terápia egyelőre nem ismert (Di Rienzo és mtsai., 2024). A hosszan fennálló krónikus gyulladás hatására a CU-s betegek 12 %-nál, a CD-s páciensek közel 50 %-nál figyelhető meg az intesztinális fibrózis manifesztációja (Rieder, 2018). A fibrózis egy irreverzibilis folyamat, amely során az adott szervben lévő specializált epitél és endotél sejtek mezenchimális sejtekké alakulnak át (Park és mtsai., 2023). Ennek következtében az ECM fehérjék felhalmozódnak és a szerv érintett része funkcióját veszti. A fibrózis gyógyszeres kezelésére egyelőre nincs lehetőség, IBD esetén rezekciós műtéttel távolítják el az érintett bélszakaszt. Releváns primer *in vitro* modell egyelőre nem áll rendelkezésre, amely segítségével tanulmányozható lehet a fibrózis sejszintű progressziója.

Az eddigi kutatások során elsősorban *in vivo* krónikus betegség állatmodelleket alkalmaztak vagy *in vitro* TGF- β indukált immortalizált sejtvonalakat (Lee és mtsai., 2023). Vizsgálataink során sikeresen optimalizáltuk a humán vastagbél biopsziából származó primer fibroblaszt sejtkultúra létrehozását és fenntartását. Ezen sejtkultúrákat egészséges és IBD-s betegek mintáiból is sikerült megvalósítani. Több, mint egy hónapig, a harmadik passzázs számig sikerült fenntartani a sejtkultúrákat. A két csoport között megfigyelhető volt, hogy a sejtek eltérő morfológiát mutattak. Azt feltételezzük, hogy az IBD-s eredetű mintában több olyan szubtípusú fibroblaszt sejt van, amely felelős a fibrózis kialakításában. Ennek megválaszolására további kísérleteket tervezünk végezni.

A fibrózis során megfigyelhető, hogy számos ECM fehérje (pl.: COL1A1) mennyisége megnő. Mindemelett a fibrotikus folyamatokat elősegítő citokinek (pl.: TGF- β és PAI-1) expressziója emelkedett szintet mutat. Kísérleteinkben megfigyelhető volt, hogy fehérje szinten megkülönböztethető volt az IBD-s eredetű fibroblaszt sejt kultúra a kontrollhoz viszonyítva. A COL1A1, TGF- β és PAI-1 fluoreszcens intenzitása szignifikánsan nagyobb volt a beteg eredetű mintákban. Mindemellett PHH3 mitózis marker is magasabb intenzitást mutatott az IBD-s

fibroblasztokban. Ez arra utal, hogy ezen sejtkultúrák proliferációs rátája magasabb. Azonban az α -SMA nem mutatott különbséget a két csoport között. Mindazonáltal a génexpressziós vizsgálatok eredményei alapján nem tudtuk elkülöníteni a kontroll mintákat az IBD-s eredetű fibroblaszt kultúráktól. Ennek oka lehet, hogy megfigyeléseink a harmadik passzáznál voltak. Ekkor a beteg fibroblaszt tenyészetek elveszíthetik a fibrózisra jellemző genotípust, a mikrokörnyezet hiánya miatt.

Összeségében elmondható, hogy az általunk létrehozott primer humán fibroblaszt sejtkultúra alkalmas lehet a fibrózis patomechanizmusának *in vitro* vizsgálatára. Mindemelett potenciális anti-fibrotikus szerek tesztelésére is alkalmasnak véljük. Azért, hogy még pontosabban elkülöníthetők legyenek a kontroll és IBD-s eredetű sejt kultúrák a jövőben szeretnénk megfigyelni a fibrózisra jellemző paramétereket korábbi passzálsági számokban (első és második). Továbbá szeretnénk pontosabb fehérjevizsgálati módszereket alkalmazni, mint az áramlási citometriás mérések és Western blot technika.

9 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Maléth József tudományos főmunkatársnak és csoportvezetőnek és Dr. Jójárt Boldizsár tudományos segédmunkatársnak, hogy folyamatosan támogatták munkámat a laboratóriumban. Tudásuk, tapasztalatuk és türelmük nélkül nem készülhetett volna el a dolgozatom.

Köszönöm Prof. Dr. Molnár Tamás professzor Úrnak és Dr. Farkas Klaudiának, valamint a Colorektális Munkacsoport minden munkatársának a segítségüket.

Köszönettel tartozom az MTA-SZTE Lendület Eritél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport minden munkatársának, hogy mindig szívesen válaszoltak felmerülő kérdéseimre, illetve hozzájárultak felkészülésemhez.

Köszönöm Sótiné Dr. Bagyánszki Mária belső konzulensi segítségét.

Nagyon köszönöm a Nemzeti Tudósképző Akadémia Szent-Györgyi Mentorprogramjának a lehetőséget.

Szeretném megköszönni a szüleimnek, hogy lehetővé tették a munkámat és mindig bíztattak, valamint köszönöm páromnak, Tamásnak a kitartó támogatást és szeretetet.

Bár ezeket a sorokat sajnos már nem olvashatja, a dolgozatot keresztapámnak, Tibinek ajánlom.

10 Irodalomjegyzék

- Akatsu, Y., Takahashi, N., Yoshimatsu, Y., Kimuro, S., Muramatsu, T., Katsura, A., Maishi, N., Suzuki, H. I., Inazawa, J., Hida, K., Miyazono, K., & Watabe, T. (2019). Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- β -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1. *Molecular Oncology*, 13(8), 1706–1724. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12504>
- Baydi, Z., Limami, Y., Khalki, L., Zaid, N., Naya, A., Mtairag, E. M., Oudghiri, M., & Zaid, Y. (2021). An Update of Research Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *The Scientific World Journal*, 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/7479540>
- Bousvaros A. (2007). Differentiating Ulcerative Colitis from Crohn Disease in Children and Young Adults: Report of a Working Group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44(5), 653–674. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31805563f3>
- Chang, C.-W., Wong, J.-M., Tung, C.-C., Shih, I.-L., Wang, H.-Y., & Wei, S.-C. (2015). Intestinal Stricture in Crohn's Disease. *Intestinal Research*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.19>
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1785-1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>
- D'Alessio, S., Ungaro, F., Noviello, D., Lovisa, S., Peyrin-Biroulet, L., & Danese, S. (2022). Revisiting fibrosis in inflammatory bowel disease: The gut thickens. *Nature Reviews*

- Gastroenterology & Hepatology*, 19(3), 169–184. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00543-0>
- Derkacz, A., Olczyk, P., Olczyk, K., & Komosinska-Vassev, K. (2021). The Role of Extracellular Matrix Components in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 10(5), 1122. <https://doi.org/10.3390/jcm10051122>
- Dharni, K., Singh, A., Sharma, S., Midha, V., Kaur, K., Mahajan, R., Dulai, P. S., & Sood, A. (2024). Trends of inflammatory bowel disease from the Global Burden of Disease Study (1990-2019). *Indian Journal of Gastroenterology*, 43(1), 188–198. <https://doi.org/10.1007/s12664-023-01430-z>
- Di Rienzo, A., Marinelli, L., Dimmito, M. P., Toto, E. C., Di Stefano, A., & Cacciatore, I. (2024). Advancements in Inflammatory Bowel Disease Management: From Traditional Treatments to Monoclonal Antibodies and Future Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 16(9), 1185. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091185>
- Freeman, H. J. (2014). Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 31. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.31>
- Frid, M. G., Kale, V. A., & Stenmark, K. R. (2002). Mature Vascular Endothelium Can Give Rise to Smooth Muscle Cells via Endothelial-Mesenchymal Transdifferentiation: In Vitro Analysis. *Circulation Research*, 90(11), 1189–1196. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000021432.70309.28>
- Gabbiani, G., Ryan, G. B., & Majno, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5), 549–550. <https://doi.org/10.1007/BF02147594>

- Greuter, T., Rieder, F., Kucharzik, T., Peyrin-Biroulet, L., Schoepfer, A. M., Rubin, D. T., & Vavricka, S. R. (2021). Emerging treatment options for extraintestinal manifestations in IBD. *Gut*, 70(4), 796–802. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322129>
- Grisham, M. (1994). Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *The Lancet*, 344(8926), 859–861. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92831-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92831-2)
- Henderson, N. C., Rieder, F., & Wynn, T. A. (2020). Fibrosis: From mechanisms to medicines. *Nature*, 587(7835), 555–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2938-9>
- Hou, J., Ma, T., Cao, H., Chen, Y., Wang, C., Chen, X., Xiang, Z., & Han, X. (2018). TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2409–2419. <https://doi.org/10.1002/jcp.26112>
- Jójárt, B., Resál, T., Kata, D., Molnár, T., Bacsur, P., Szabó, V., Varga, Á., Szántó, K. J., Pallagi, P., Földesi, I., Molnár, T., Maléth, J., & Farkas, K. (2023). Plasminogen Activator Inhibitor 1 Is a Novel Faecal Biomarker for Monitoring Disease Activity and Therapeutic Response in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, jjad160. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjad160>
- Kaiko, G. E., Chen, F., Lai, C.-W., Chiang, I.-L., Perrigoue, J., Stojmirović, A., Li, K., Muegge, B. D., Jain, U., VanDussen, K. L., Goggins, B. J., Keely, S., Weaver, J., Foster, P. S., Lawrence, D. A., Liu, T.-C., & Stappenbeck, T. S. (2019). PAI-1 augments mucosal damage in colitis. *Science Translational Medicine*, 11(482), eaat0852. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0852>

- Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 573–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101225>
- Kumar, A., Yassin, N., Marley, A., Bellato, V., Foppa, C., Pellino, G., Myrelid, P., Millan, M., Gros, B., Avellaneda, N., Catalan-Serra, I., El-Hussuna, A., Cunha Neves, J. A., Roseira, J., Cunha, M. F., Verstockt, B., Bettenworth, D., Mege, D., & Brookes, M. J. (2023). Crossing barriers: The burden of inflammatory bowel disease across Western Europe. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 16, 17562848231218615. <https://doi.org/10.1177/17562848231218615>
- Leask, A., Holmes, A., & Abraham, D. J. (2002). Connective tissue growth factor: A new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Current Rheumatology Reports*, 4(2), 136–142. <https://doi.org/10.1007/s11926-002-0009-x>
- Lee, C. H., Koh, S.-J., Radi, Z. A., & Habtezion, A. (2023). Animal models of inflammatory bowel disease: Novel experiments for revealing pathogenesis of colitis, fibrosis, and colitis-associated colon cancer. *Intestinal Research*, 21(3), 295–305. <https://doi.org/10.5217/ir.2023.00029>
- Li, G., Ren, J., Hu, Q., Deng, Y., Chen, G., Guo, K., Li, R., Li, Y., Wu, L., Wang, G., Gu, G., & Li, J. (2016). Oral pirfenidone protects against fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and TGF- β signaling in a murine colitis model. *Biochemical Pharmacology*, 117, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.08.002>
- Lin, S.-N., Mao, R., Qian, C., Bettenworth, D., Wang, J., Li, J., Bruining, D. H., Jairath, V., Feagan, B. G., Chen, M.-H., Stenosis Therapy and Antifibrotic Research (STAR) Consortium, & Rieder, F. (2022). Development of antifibrotic therapy for stricturing

- Crohn's disease: Lessons from randomized trials in other fibrotic diseases. *Physiological Reviews*, 102(2), 605–652. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2021>
- Lu, C., Baraty, B., Lee Robertson, H., Filyk, A., Shen, H., Fung, T., Novak, K., Ma, C., Panaccione, R., Achkar, J., El Ouali, S., Bruining, D., Jairath, V., Feagan, B., Rieder, F., & the Stenosis Therapy and Research (STAR) Consortium. (2020). Systematic review: Medical therapy for fibrostenosing Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 51(12), 1233–1246. <https://doi.org/10.1111/apt.15750>
- Ma, Y., Guan, Q., Bai, A., Weiss, C. R., Hillman, C.-L., Ma, A., Zhou, G., Qing, G., & Peng, Z. (2010). Targeting TGF- β 1 by employing a vaccine ameliorates fibrosis in a mouse model of chronic colitis: *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(6), 1040–1050. <https://doi.org/10.1002/ibd.21167>
- Meng, X., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
- Nguyen, C., Palazzo, C., Grabar, S., Feydy, A., Sanchez, K., Zee, N., Quinquis, L., Ben Boutieb, M., Revel, M., Lefèvre-Colau, M.-M., Poiraudreau, S., & Rannou, F. (2015). Tumor necrosis factor- α blockade in recurrent and disabling chronic sciatica associated with post-operative peridural lumbar fibrosis: Results of a double-blind, placebo randomized controlled study. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 330. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0838-4>
- Park, J. M., Kim, J., Lee, Y. J., Bae, S. U., & Lee, H. W. (2023). Inflammatory bowel disease–associated intestinal fibrosis. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 57(1), 60–66. <https://doi.org/10.4132/jptm.2022.11.02>

- Ray, S., De Salvo, C., & Pizarro, T. T. (2014). Central role of IL-17/Th17 immune responses and the gut microbiota in the pathogenesis of intestinal fibrosis: *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(6), 531–538. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000119>
- Rieder, F. (2018). *Fibrostenotic Inflammatory Bowel Disease*. Springer International Publishing AG.
- Rieder, F., & Fiocchi, C. (2009). Intestinal fibrosis in IBD—a dynamic, multifactorial process. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6(4), 228–235. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2009.31>
- Rieder, F., Mukherjee, P. K., Massey, W. J., Wang, Y., & Fiocchi, C. (2024). Fibrosis in IBD: From pathogenesis to therapeutic targets. *Gut*, [gutjnl-2023-329963](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-329963). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-329963>
- Rodansky, E. S., Johnson, L. A., Huang, S., Spence, J. R., & Higgins, P. D. R. (2015). Intestinal organoids: A model of intestinal fibrosis for evaluating anti-fibrotic drugs. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(3), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.03.033>
- Sponheim, J., Pollheimer, J., Olsen, T., Balogh, J., Hammarström, C., Loos, T., Kasprzycka, M., Sørensen, D. R., Nilsen, H. R., Kuchler, A. M., Vatn, M. H., & Haraldsen, G. (2010). Inflammatory Bowel Disease-Associated Interleukin-33 Is Preferentially Expressed in Ulceration-Associated Myofibroblasts. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 2804–2815. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100378>
- Sziksz, E., Pap, D., Lippai, R., Béres, N. J., Fekete, A., Szabó, A. J., & Vannay, Á. (2015). Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation*, 2015(1), 764641. <https://doi.org/10.1155/2015/764641>

- Tichansky, D., Cagir, B., Yoo, E., Marcus, S. M., & Fry, R. D. (2000). Strictureplasty for Crohn's disease: Meta-analysis. *Diseases of the Colon & Rectum*, 43(7), 911–919.
<https://doi.org/10.1007/BF02237350>
- Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 51–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
- Valatas, V. (2017). Stromal and immune cells in gut fibrosis: The myofibroblast and the scarface. *Annals of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0146>
- Vallance, B. A., Gunawan, M. I., Hewlett, B., Bercik, P., Van Kampen, C., Galeazzi, F., Sime, P. J., Gauldie, J., & Collins, S. M. (2005). TGF- β 1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(1), G116–G128. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00051.2005>
- Wallace, K. L. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 6. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.6>
- Wang, J., Lin, S., Brown, J. M., Van Wagoner, D., Fiocchi, C., & Rieder, F. (2021). Novel mechanisms and clinical trial endpoints in intestinal fibrosis*. *Immunological Reviews*, 302(1), 211–227. <https://doi.org/10.1111/imr.12974>
- Wang, X., Guo, L., Huang, J., Jiang, S., Li, N., Mu, H.-H., & Xu, C. (2023). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Potentiates Neutrophil Infiltration and Tissue Injury in Colitis. *International Journal of Biological Sciences*, 19(7), 2132–2149.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.75890>

- Wang, Y., Huang, B., Jin, T., Ocansey, D. K. W., Jiang, J., & Mao, F. (2022). Intestinal Fibrosis in Inflammatory Bowel Disease and the Prospects of Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Frontiers in Immunology*, 13, 835005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835005>
- Yu, Y. R., & Rodriguez, J. R. (2017). Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery*, 26(6), 349–355. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2017.10.003>

11. Tételes szerzői hozzájárulás

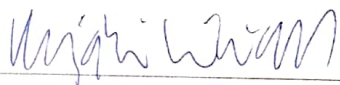
A 37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott (**Kajári Lilian**) nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott (**Primer humán intesztinális fibroblaszt sejtkultúra létrehozása és karakterizálása gyulladásos bélbetegségben**) című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

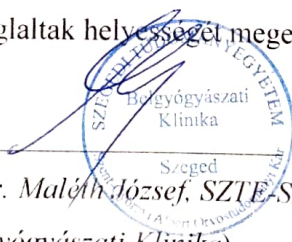
Részfeladat ²	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
Humán vastagbél fibroblaszt sejtkultúra létrehozása biopszia mintából és a sejtkultúrák fenntartása	4
RNS izolálás	5
DNS reverz transzkripció	5
Vég-pont analízis PCR	5
qRT-PCR	5
Immunfluoreszcens festés	5
Statisztikai analízis	4
Grafikus prezentáció	5

Kelt: Szeged, 2025. 01. 08.



Pályamunkát benyújtó hallgató (**Kajári Lilian**)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (**Dr. Malóth József, SZTE-SZAOK**)
Belgyógyászati Klinika
aláírása

¹ A kutatási projekt azon részfadatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.
² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.