



**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Élettani és Biokémiai Tanszék**  
**Biokémiai Osztály**

**Bakteriális sejtfalkomponensek hatásainak  
összehasonlítása két-, illetve háromdimenziós  
csirke eredetű májsejttenyészeteken**

**TDK-dolgozat**

**Készítette:**

Szentgyörgyi Ákos

**Témavezetők:**

Dr. Sebők Csilla

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,  
tanszéki állatorvos

Vörösházi Júlia

Állatorvostudományi Egyetem, Élettani és Biokémiai Tanszék,  
tanszéki mérnök

**Budapest, 2020**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
Bevezetés.....	3
Irodalmi áttekintés.....	4
A kétdimenziós sejttenyésztés.....	4
A háromdimenziós sejttenyésztés.....	6
A kétdimenziós és háromdimenziós sejttenyésztés összehasonlítása.....	10
A bakteriális sejtfalkomponensek hatásai.....	12
Célkitűzés.....	15
Anyag és módszer.....	16
Kísérleti állatok.....	16
Vegyszerek.....	16
Előkészületek, boncolás.....	16
A hepatociták és nem-parenchymális sejtek izolálása és a sejttenyészetek létrehozása 2D módszerrel.....	18
A kétdimenziós sejttenyészetek kezelése.....	20
A hepatociták és nem-parenchymális sejtek izolálása és a sejttenyészetek létrehozása 3D módszerrel.....	20
A háromdimenziós sejttenyészetek kezelése.....	21
Mérések.....	21
Statisztika.....	22
Eredmények.....	23
A CCK-8 teszt eredményei kétdimenziós sejttenyészet esetében.....	23
A CCK-8 teszt eredményei háromdimenziós sejttenyészet esetében.....	24
Az interleukin termelés közti különbségek két-, illetve háromdimenziós sejttenyészetek esetében.....	25
A gyulladásos citokinek koncentráció mérésének eredményei kétdimenziós sejttenyészet esetében.....	25
A gyulladásos citokinek koncentráció mérésének eredményei háromdimenziós sejttenyészet esetében.....	27
Megbeszélés.....	30
Összefoglalás.....	33
Summary.....	35
Köszönetnyilvánítás.....	37
Irodalomjegyzék.....	38

## Rövidítések jegyzéke

2D = kétdimenzió	MAPK = mitogen-activated protein kinase, mitogén aktivált protein kináz
3D = háromdimenzió	MD-2 = myeloid differentiation factor-2, myeloid differenciációs faktor 2
BSA = bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin	MPS = mononuclear phagocyte system, mononukleáris fagocita rendszer
CCK-8 = cell counting kit-8	mRNS = hírvivő ribonukleinsav
CD14 = cluster of differentiation 14	MyD88 = myeloid differentiation factor 88, myeloid differenciációs faktor 88
CYP450 = citokróm 450 enzimcsalád	NADP <sup>+</sup> = Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
EGTA = etilén-glikol-tetraacetát	NF-κB = nuclear factor-kappa B, nukleáris faktor-kappa B
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay	PAMP = pathogen associated molecular pattern, patogén asszociált molekuláris mintázat
FBS = fetal bovine serum, magzati szarvasmarha szérum	RNS = ribonukleinsav
hMSC = human mesenchymal stromal cells, humán mezenhimális sztróma sejtek	STC-1 = sztanniokalcin-1
IκBα = NF-κB inhibitor α	TLR-4 = Toll-like receptor 4
IL-6 = interleukin-6	TNF = tumor necrosis factor, tumor nekrozis faktor
IL-8 = interleukin-8	TRAF = TNF receptor-associated factor, TNF receptor asszociált faktor
IRAK-1 = interleukin-1 receptor-associated kinase 1, interleukin-1 receptor asszociált kináz 1	WST-8 = water soluble tetrasolium salt, vízben oldódó tetrazolium só
LBP = LPS-binding protein, LPS-kötő fehérje	
LPS = lipopoliszacharid	
LTA = lipoteikólsav	

## **Bevezetés**

Az élőlények szervezetébe jutva számos káros anyag vált ki gyulladást. Ide sorolhatók a Gram negatív baktériumok sejtfalát alkotó lipopoliszacharidok (LPS), valamint a Gram pozitív baktériumok egyik sejtalkomponense, a lipoteikólsav (LTA). Jelenleg is aktív tanulmányok vizsgálják e bakteriális sejtalkomponensek immunválaszra kifejtett hatásait. A kutatások során különböző típusú sejteket tenyésztenek a már régóta használt kétdimenziós technika, illetve az utóbbi évtizedekben folyamatosan fejlődő háromdimenziós módszer alkalmazásával. Az utóbbi módszer előnye, hogy az általa létrehozott sejtenyészetek felépítése közelebb áll az élő szövetek struktúrájához, így jó lehetőséget nyújt az LPS és LTA által keltett molekuláris szintű változások vizsgálatára.

Munkánk során két-, és háromdimenziós csirke eredetű májsejt mono-kultúrán és májsejt – nem-parenchymális sejt ko-kultúrán vizsgáltuk a különféle bakteriális sejtalkomponensekre adott gyulladást okozó válaszokat, illetve a tenyészetek sejteinek metabolikus aktivitását. A gyulladást 10 és 50 µg/ml koncentrációjú LPS és ugyanilyen koncentrációjú LTA kezeléssel váltottuk ki, majd a gyulladást mértékét a tápfolyadékban szendvics ELISA segítségével mért interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8) gyulladást okozó citokinek koncentrációja alapján határoztuk meg. A sejtek metabolikus aktivitásának vizsgálatára CCK-8 tesztet használtunk.

## **Irodalmi áttekintés**

### **A kétdimenziós sejttenyésztés**

#### *A sejttenyésztés története, kialakulása*

A sejttenyésztés kezdete egészen a 19. század végéig nyúlik vissza. Az első úttörők közé tartozik Wilhelm Roux, aki néhány napig képes volt életben tartani csirke embrió velőlemezből származó idegsejteket pufferelt sóoldatban. A sejttenyésztés alapköve egy amerikai kutató nevéhez, Ross Granville Harrisonhoz, fűződik, aki 1907-ben létrehozott egy béka idegsejtekből álló sejt kultúrát, ami életben maradt és növekedett az állaton kívül. Az alkalmazott módszer az úgynevezett függőcsepp technika volt, amelyet már korábban is alkalmaztak baktériumok tanulmányozására. R. G. Harrison munkája során egy steril tárgylemezre helyezte az idegsejtekből álló mintát, majd friss nyirkot cseppentett rá és megvárta, míg az kicsapódik. Ezt követően megfordította a lemezt, amelyen a minta „függő cseppként” viselkedett, és a sejtek ebben a cseppben tudtak növekedni (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Az 1930-as években Charles Lindbergh kifejlesztett egy perfúziós pumpát, amellyel életben tartotta az élő sejteket, szöveteket, ezzel könnyebbé téve a sejttenyésztés egyik kritikus lépését, a tápfolyadék biztosítását (Sade, 2005). Azonban a nagy áttörések ellenére az 1930-as évek végére a kutatások vakvágányra futottak. A sejttenyésztés kudarcnak tűnt, mert túlságosan nehéz volt a létrehozás és a kezelés, valamint az eredményeket nem tudták megismételni és számszerűsíteni (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

Az 1940-es években pozitív változás következett be, és kivirágzott a tudomány e területe, ugyanis sikerült létrehozni az első sejt vonalat, amely fibroblastokon alapult, majd 1946-ban és 1947-ben szintetikus tápfolyadékot fejlesztettek ki mind a növényi-, mind az állati sejtekhez. (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Ezt követően az 1950-es és 1960-as években robbanásszerű fejlődés következett, a kutatók egyre nagyobb sikereket értek el. Ezek közül kiemelkedő Harris és Watkins 1965-ös kísérlete, melynek során emberi és egér sejtek felhasználásával hibrid emlősejteket hoztak létre (Harris et al., 1965).

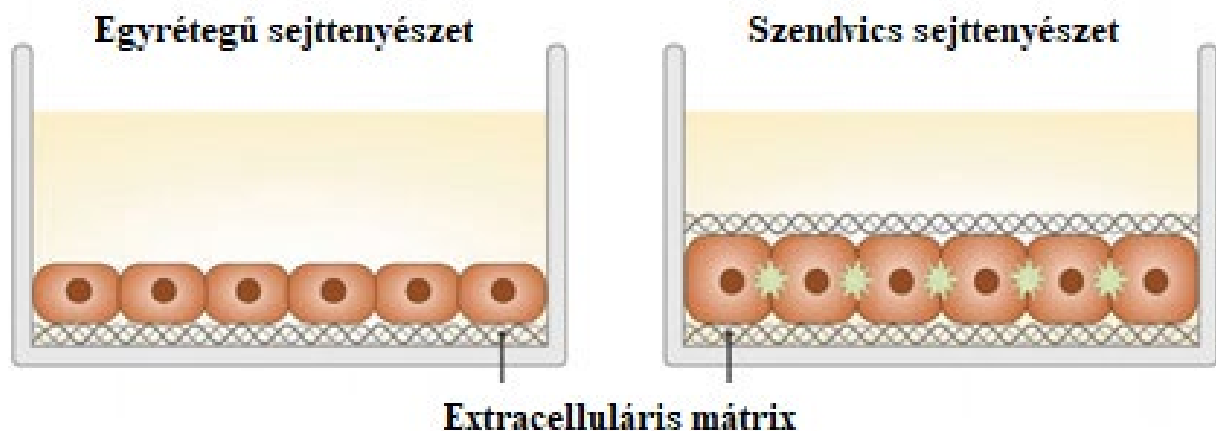
A 2000-es években a kutatók felnőtt egérből származó fibroblastok felhasználásával képesek voltak négy különböző transzkripciós faktor expressziójának indukálására, melynek hatására az embrionális őssejtekhez nagyon hasonló sejtcsoport alakult ki. Emberi sejtekkel is

folgytattak sikeres kísérleteket, ahol fibroblastokból hoztak létre őssejtekre hasonlító sejtcsoportokat (Takahashi és Yamanaka, 2006).

### A kétdimenziós sejtenyésztés módszerei

A kétdimenziós sejtenyésztés során számos módszert alkalmaznak. A hagyományos eljárás azon alapszik, hogy a sejtek kitapadnak egy extracelluláris mátrix komponenssel, leggyakrabban kollagénnel bevont felületre, mint például egy Petri-csészére (Duval et al., 2017). A kollagén az extracelluláris mátrix egyik legfontosabb alkotóeleme, ezért a természetes közeg kialakításában fontos szerepe van, hiszen nélküle a sejtek nem tudnak differenciálódni. Emellett segíti a felületre való kitapadásukat és egyrétegbe rendeződésüket, valamint a növeli az élethosszukat (Strom és Michalopoulos, 1982). Sejtípustól függően más extracelluláris mátrix összetevőket is alkalmazhatnak, mint a fibronectint vagy a laminint, de szintetikus molekulákat is, mint pl. a poli-L-lizint. A megfelelően bevont tenyésztőedény felületén egy egyrétegű sejtenyészet alakul ki, amelyben a sejtek azonos mértékben növekedhetnek, hiszen hasonló mennyiségű tápanyagot képesek felvenni. Sok kutató a mai napig is ezt a módszert használja, mert egyszerű és hatékony, azonban hátránya, hogy az ezzel az eljárással létrehozott sejtenyészetek messze állnak az élő szervezetre jellemző szövetek természetes felépítésétől (Duval et al., 2017).

A szendvics tenyészet bizonyos szempontból kedvezőbbnek bizonyult számos sejt tenyésztése szempontjából, mint a hagyományos technika. Ennek során a sejteket két extracelluláris mátrix, poliakrilamidból vagy kollagénből álló réteg közé helyezzük (**1.ábra**). A szendvics tenyészetben a sejtek alakja és működése jobban hasonlít az élő szövetekéhez (Duval et al., 2017).



**1.ábra:** Egyrétegű és szendvics sejtenyészet  
(Forrás: Ölander, 2019)

Egy kutatás során összehasonlították az albumint meghatározó mRNS szintjét frissen izolált májsejtek, egyrétegű, kétdimenziós tenyészetében és szendvics tenyészetében. Az eredmények azt mutatták, hogy a szendvics tenyészetben sokkal nagyobb mennyiségű mRNS volt jelen, és sokkal hosszabb ideig maradt magas szinten, mint az egyrétegű sejttenyészet esetében. Hat hét elteltével közel azonos mennyiségű albumin mRNS-t mértek, mint a frissen izolált májsejtekben, ez alapján megállapították, hogy a szendvics tenyésztés során tapasztaltak hasonlóak a szervezetben zajló folyamatokhoz (Dunn et al., 1992).

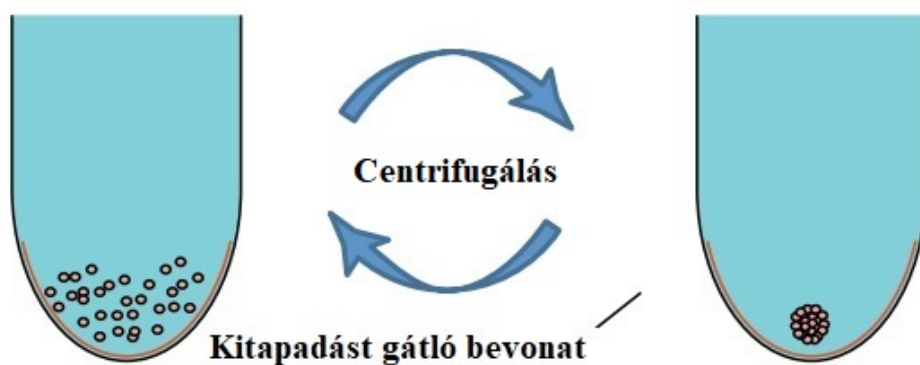
A kétdimenziós és a következő fejezetben ismertetésre kerülő háromdimenziós sejttenyészetek készítéséhez viszonylag rövid életidejű, frissen izolált sejtek, ill. korlátlan életidejű, *in vitro* körülmények között transzformált vagy daganatsejtekből készült sejtvonalak sejtjei használhatók.

## **A háromdimenziós sejttenyésztés**

### *A kezdetek és a módszerek*

A 3D sejttenyésztés alapjai csaknem 40 éve alakultak ki, ekkor használtak először úszó kollagén gélt, amely a kétdimenziós sejttenyésztésben használt, síkfelülethez kötött kollagénhez képest azért bizonyult jobbnak, mert nagyobb mértékű differenciálódást tett lehetővé a sejtek számára. Ezt egy kísérlettel is bizonyították, mely során a síkfelülethez kötött kollagénen tenyésztett sejteket áthelyezve az úszó kollagén gélre azok képesek voltak tovább differenciálódni (Emerman és Pitelka, 1977). Az utóbbi években az érdeklődés a háromdimenziós sejttenyésztés iránt megnövekedett, és egyre több kutatás indult el e területen. Ennek legfőbb oka, hogy jelentős előnyökkel rendelkezik a hagyományos kétdimenziós tenyészetekkel szemben, hiszen alkalmas olyan környezet létrehozására, amely lényegesen közelebb áll az élettani körülményekhez (Comley, 2017). A sejtek e technika alkalmazásával több síkban találkoznak egymással, valamint a környezetükben található egyéb anyagokkal is, ami változatos sejt-sejt és sejt-környezet interakciókhoz vezet (Souza et al., 2018). A jelenleg használatban lévő módszereket úgy alakították ki, hogy a sejttenyészetek mai ismereteinknek megfelelően a lehető legjobban hasonlítsanak az élő szervezetben található szövetek felépítéséhez (Breslin és O'Driscoll, 2013). Az utóbbi években ezt a technikát sikeresen alkalmazták a rákkutatás, a gyógyszerkutatás és a toxikológia területén egyaránt (Comley, 2017).

Az egyik legegyszerűbb lehetőség az ún. „forced-floating” módszer (**2. ábra**), mely során háromdimenziós szferoidokat hozunk létre. Az eljárás során a tenyésztőedényeket 0,5%-os polihidroxietil-metakriláttal vonják be, ezzel gátolják a sejtek felületre való kitapadását. Ezután a bevont lyukakba helyezik a sejteket, amelyek a lyuk alján diffúzan oszlanak el. Ezt követően centrifugálják a mintákat, hogy a sejtek egy területre tömörüljenek össze, érintkezzenek egymással és összetapadjanak (Ivascu és Kubbies, 2006). Ez a módszer egyszerű, reprodukálható, valamint 96 lyukú edény használatával könnyen és gyorsan lehet sok, morfológiailag nagyon hasonló szferoidot létrehozni. A módszer hátránya, hogy a tenyésztőedények előkészítése idő- és pénzigényes (Breslin és O’Driscoll, 2013).

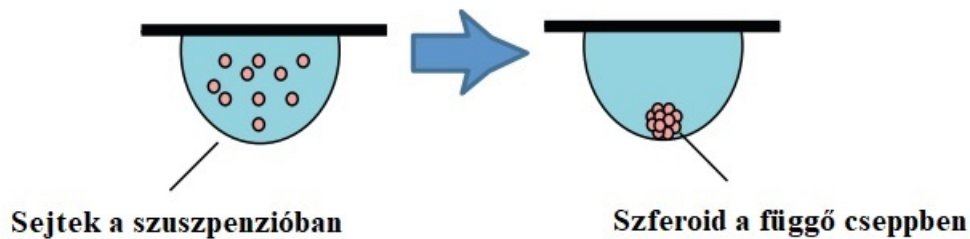


**2. ábra:** "Forced floating" módszer  
(Forrás: Breslin és O’Driscoll, 2013)

A következő lehetőség a függő csepp módszer (**3. ábra**), amely szintén az egyszerűbb eljárások közé tartozik (Breslin és O’Driscoll, 2013). Ez a technika a kétdimenziós tenyésztés során már említett, R. G. Harrison által alkalmazott technikához hasonló (Breslin és O’Driscoll, 2013). A folyamat során a sejtszuszpenziót tartalmazó tenyésztőedényt fejjel lefelé kell fordítani, és a felületi feszültségnek köszönhetően kialakul a függő csepp, amelynek csúcsában a sejtek felhalmozódnak és összetapadnak (Breslin és O’Driscoll, 2013). A módszernek az előnye, hogy a reprodukálhatósága igen magas, és számos sejtvonal esetében is alkalmazható hasonló hatékonysággal és eredményekkel, hátránya, hogy a tápfolyadék cseréje körülményes (Breslin és O’Driscoll, 2013).

Egy máj- és emlő tumorsejtekkel végzett kutatás során megfigyelték, hogy a kialakult sejtesoportok élettani környezetet alakítottak ki, amelyben a tenyészet szerkezete jól szervezett volt, illetve a sejtek saját extracelluláris mátrixot termeltek, így a sejttenyészet szövetszerűnek volt tekinthető (Kelm et al., 2003).





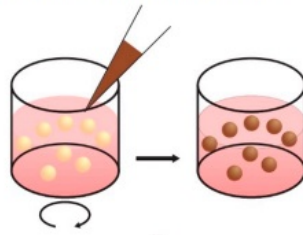
**3. ábra: Függő csepp módszer**  
*(Forrás: Breslin és O'Driscoll, 2013)*

Mi a sejttenyésztéshez a mágneses bioprinting háromdimenziós módszert (**4. ábra**) alkalmaztuk, melyről 2010 óta egyre több tudásanyag áll rendelkezésünkre. Az eljárás lényege, hogy a sejtekhez biokompatibilis mágneses tulajdonsággal rendelkező nanorészecskéket adunk, melyek vas-oxidból, aranyból és poli-L-lizinből állnak. A részecskék kapcsolódnak a sejtekhez, ezáltal magnetizálják őket, és ennek következtében mágnes segítségével különböző formákat lehet kialakítani, a mágnes alakjától és a méretétől függően. A technika használata során lehetőség van transzmissziós vagy pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizuálisan megvizsgálni a kialakult szferoidok morfológiáját. A módszer előnye, hogy nincs szükség specifikus tápfolyadékra, állványra, mátrixra és még kiöntött géltre sem. Ez egy egyszerű, rugalmas és hatékony technika, amelyet számos területen használnak, többek között a biotechnológiában és az őssejtkutatásban is (Souza et al., 2010).

A sejtek lerakása egy sejttaszító tenyésztőedényre



A sejtek magnetizálása a mágneses nanorészecskék hozzáadásával és az inkubáció révén



A sejtek szferoidokba rendeződése a szferoid drive-ra helyezést követően



**4. ábra:** *Mágneses bioprinting háromdimenziós módszer*  
(Forrás: Desai et al., 2017 alapján)

Egy kísérlet során fibroblast sejteket különböző koncentrációjú citotoxikus anyagokkal kezeltek, és azt vizsgálták, hogy milyen mértékben kapcsolódnak össze a sejtek a szferoid szerkezet kialakulásánál. A vizsgálat során valós idejű felvételeket készítettek a sejtek összekapcsolódásáról és a szferoid kialakulásáról. Eredményeik alapján kevésbé kapcsolódtak össze azok a sejtek, amelyeket magasabb koncentrációjú citotoxikus anyaggal kezeltek, tehát a sejtek szferoiddá alakulásának mértéke függ az alkalmazott toxikus vegyületek dózisától (Tseng et al., 2015).

#### A jelen és a jövő

A háromdimenziós sejttenyésztésnek számos, szerteágazó felhasználási módja lehetséges a kutatásban. Egy felmérés szerint jelenleg az ezzel kapcsolatos kutatások 30%-a a módszerek fejlesztésével foglalkozik, további 15%-át regeneratív gyógyszerek fejlesztése során, 15%-át a tumorbiológiában, 12%-át az őssejtkutatásban, 9%-át az alapkutatás területén, 19%-át pedig egyéb kutatások (toxikológia, gyógyszeripar) során alkalmazzák (Comley, 2017). Ahhoz, hogy a jövőben még sikeresebb eredményeket tudjanak elérni, szükség van a

sejttenyésztési módszerek fejlesztésére. A jövőben számos előnnyel járna, ha a kutatók többször alkalmaznának háromdimenziós módszereket a kétdimenziós sejttenyésztés helyett (Mazzoleni et al., 2009).

#### A legfontosabb jellemzők.

A háromdimenziós sejttenyésztés új megközelítést tett lehetővé a tudományban, hiszen az ilyen sejttenyészetek közelebb állnak az élőszervezetben zajló komplex folyamatokhoz és körülményekhez. A sejttenyészetek megjelenése, valamint a sejtek növekedése és az általuk kialakított háromdimenziós szerkezet nagyon hasonlít az *in vivo* környezethez, ezért jól lehet modellezni a háromdimenziós sejttenyészeteken a környezet pH-jának változását, a sejtek hipoxiás állapotát, a különböző fokú sejtproliferációt, valamint az apoptózissal és a gyógyszerekkel szemben kialakuló rezisztenciát (Souza et al., 2018).

A háromdimenziós sejttenyészetek megfelelőek ahhoz, hogy kialakuljon a sejtek típusától és a sejtet körülvevő környezettől függő polaritása. Erre egy kiváló példa az epiteliális sejt, amelyre jellemző a különböző tulajdonságokkal rendelkező apikális és bazális felszín (Yamada és Cukierman, 2007). A háromdimenziós sejttenyészetek szerkezete lehetővé teszi megfelelő sejt-sejt és a sejt-környezet interakció kialakulását. Acinus-szerű szferoidokban lumen képződést is megfigyeltek, ami annak volt köszönhető, hogy a centrálisan elhelyezkedő sejtekre nagymértékű apoptózis, valamint alacsony osztódási arány, míg a periférián találhatóakra a magas fokú proliferáció és a kismértékű apoptózis volt jellemző (Kapałczyńska et al., 2018).

### **A kétdimenziós és háromdimenziós sejttenyésztés összehasonlítása**

#### A legfőbb különbségek

Az első fontos különbség a kétféle sejttenyészet kialakításához szükséges időben rejlik. Kétdimenziós sejt kultúra esetében a sejtek lerakása és letapadása között néhány óra, míg háromdimenziós esetében több nap telik el. A kétdimenziós sejttenyészetek létrehozása egyszerűbb és biztosabb, mint a háromdimenziósoké, a már kidolgozott protokolloknak köszönhetően (Kapałczyńska et al., 2018).

Az élő szervezetben zajló folyamatokat, a szövetek természetes szerkezetét a kétdimenziós tenyészetben kevésbé lehet reprodukálni, míg a háromdimenziós tenyészet nagy hasonlósággal utánozza. A sejtek egymással és az extracelluláris környezettel történő interakciói következtében egyedi környezet alakul ki a sejttenyészetben. A kétdimenziós

módszer használata során ilyen interakciók kialakulására nincs lehetőség (Kapałczyńska et al., 2018).

A kétdimenziós tenyésztés során megváltozik a sejtek morfológiája, elveszítik változatos megjelenésüket és a polaritásukat, míg a háromdimenziós tenyésztetek esetében mindezen tulajdonságaik megmaradnak. A kétdimenziós technika esetében a sejtek elhelyezkedésüknél fogva egyenlő mennyiségben férnek hozzá az élethez nélkülözhetetlen anyagokhoz, mint például az oxigénhez, a különféle tápanyagokhoz, valamint az anyagcseretermékekhez és jelátviteli molekulákhoz. A háromdimenziós technika esetében azonban a szferoid belsejében növekvő sejtek nehezebben férnek hozzá a fent említett anyagokhoz, mint a kívül lévők, ami *in vivo* is számtalan esetben előfordulhat (Kapałczyńska et al., 2018).

A kétdimenziós sejttenyésztés kisebb anyagi ráfordítással megvalósítható, illetve a különböző tápfolyadékok, oldatok széles választékban elérhetőek a kereskedelemben. Ezzel szemben a háromdimenziós sejttenyésztés költségesebb és több időt igényel (Kapałczyńska et al., 2018).

#### *A molekuláris mechanizmusokban tapasztalt különbségek*

A sejtproliferáció mértékét megvizsgálták két- és háromdimenziós sejttenyészeteken is. Az egyik vizsgálat prosztata tumorsejtekkel történt, ahol azt tapasztalták, hogy a kétdimenziós tenyészet esetében magasabb fokú a proliferáció, mint a háromdimenziós tenyészet esetében. Azonban az utóbbi esetében tapasztalt kisebb mértékű proliferáció ellenére két integrin, a  $\beta 1$  és a  $\beta 4$  mennyiségének növekedését figyelték meg, melyek a sejtek polarizációjáért és a sejtek differenciálódásáért felelősek (Chitcholtan et al., 2013).

A következő kísérlet során prosztata tumorsejtek kemoterápiás gyógyszerekre való érzékenységét vizsgálták. A sejteket tumorelleses gyógyszerekkel, paklitaxellel és doketaxellel kezelték, amelyek a sejtosztódást akadályozzák a mikrotubulusok depolimerizációjának gátlása révén. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a háromdimenziós tenyészet sejtjei kevésbé érzékenyek az alkalmazott gyógyszerek káros hatásaira, tehát ellenállóbbak e gyógyszerekkel szemben, mint a kétdimenziós tenyészet sejtjei (Souza et al., 2018).

Génexpressziós szinten is tapasztaltak különbségeket a kétféle tenyésztési módszer között. A kísérletben 3T3 sejtvonalú fibroblastokat tenyésztettek és kezelték öt toxikus vegyülettel. A vizsgálat során 364 gént figyeltek meg, ebből 92 gén esetében szignifikáns különbség mutatkozott a két- és a háromdimenziós tenyészetek között. Az érintett génekből 21

kapcsolódik az apoptózishoz, és ebből 14 gén csökkent expressziót mutatott a háromdimenziós tenyészet esetében. A vizsgált gének közül 8 gén kapcsolódott a retinol metabolizmushoz, ezek közül két gén esetében tapasztaltak alacsonyabb szintű expressziót a háromdimenziós módszer során. A maradék 63 gén az aktin citoszkeleton szabályozásában játszik szerepet. Ezek közül 51 génnél figyeltek meg alacsonyabb expressziót a kétdimenziós tenyészethez képest (Tseng et al., 2015).

Egy Desai és munkatársai által végzett 2017-es kutatás során májsejteket tenyésztettek kétdimenziós és háromdimenziós módszerrel, majd ezeket különböző vegyületekkel kezelték, és összehasonlították a tapasztaltakat. A fő szempont a citokróm P450 enzimek aktivitásának változása volt különböző serkentő és gátló anyagok hozzáadása után. Azt tapasztalták, hogy a CYP450 aktivitás minden esetben magasabb volt a háromdimenziós tenyésztés során. Azonban a kontrolhoz viszonyítva a kétdimenziós sejtenyészet esetében többszörösére nőtt az aktivitás a serkentő vegyületek hatására, míg a háromdimenziós esetében kisebb mértékű volt az emelkedés. Ezzel ellentétes eredményt tapasztaltak a gátló vegyületek alkalmazása során (Desai et al., 2017).

## **A bakteriális sejtalkomponensek hatásai**

### *Az endotoxin ellenes folyamat jellemzői*

Az endotoxinok olyan, a baktérium sejtfalában található molekulák, melyek a mikroorganizmusok szétesése során szabadulnak fel, és a szervezetbe jutva gyulladási immunválaszt váltanak ki. Az egyik legismertebb endotoxin a lipopoliszacharid (LPS), amely a Gram-negatív baktériumok sejtfalában található (Dickson és Lehmann, 2019), azonban a Gram-pozitív baktériumokban található lipoteikólsav (LTA) is endotoxinnak tekinthető, hiszen felépítése és gyulladáskeltő hatása egyaránt hasonlít az LPS-hez (Guidet et al., 1994).

A szervezetbe jutott patogéneket a patogén asszociált molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern, PAMP) alapján az immunrendszer mintázatfelismerő receptorai ismerik fel. A Gram-negatív baktériumok esetében a fő PAMP az LPS, melynek hatására az immunsejtek aktiválódnak, a gyulladáskeltő mediátorok a sejtekből a környezetbe jutnak és kifejtik sokrétű hatásukat. Ezen kívül reaktív oxigén gyökök keletkeznek, amelyek a károsíthatják az endoteliális sejteket, ezáltal a mikrokeringés zavart szenved, és súlyos többszervi elégtelenség alakulhat ki (Dickson és Lehmann, 2019).

A keringésbe jutott LPS először a májban termelődő LPS-kötő fehérjéhez (LBP) kapcsolódik, majd ehhez kötődve jut el a véráramon keresztül a makrofágok és monociták

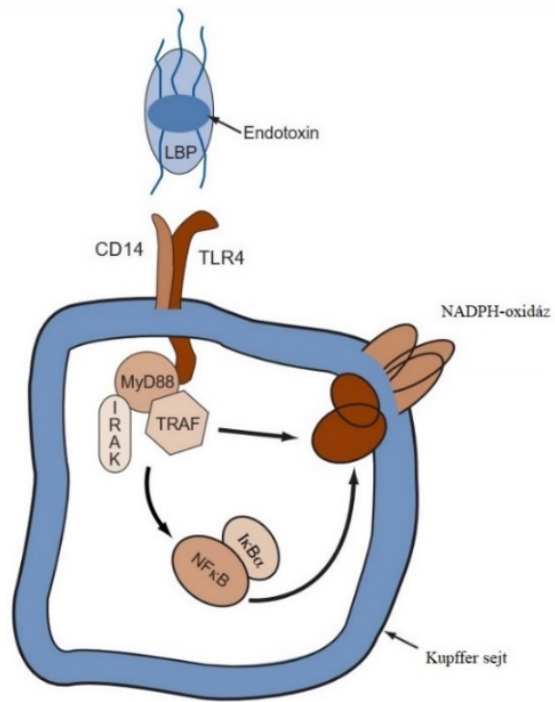
felületén található CD14 receptorokhoz (Munford, 2005). A kötődés aktiválja a Toll-Like Receptor 4-et (TLR-4) és a myeloid differenciációs faktor 2-t (MD-2), melyek több intracelluláris jelátviteli folyamatot indítanak el az immunsejtekben. Ezek gyulladásozó faktorok, mint például gyulladásozó citokinek termelődéséhez vezetnek (interleukin-6, tumor nekrozis faktor- $\alpha$ ) (Dickson és Lehmann, 2019).

A Gram-pozitív baktériumok esetében a fő PAMP a sejtfalet alkotó LTA, amely az LPS-nél leirtakhoz hasonló immunfolyamatokat indít el. A legfőbb különbség közöttük az LTA hatásában fontos szerepet játszó LTA specifikus Toll-Like Receptor 2 (Dickson és Lehmann, 2019). A különböző eredetű LTA-k eltérő intracelluláris folyamatokat, más-más mértékben aktiválnak, pl. a *Lactobacillus plantarum* eredetű LTA kis mértékben, míg a *Lactobacillus delbruekii* eredetű LTA intenzíven aktiválja a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli út vonalat, aminek az eredménye a gyulladásozó citokinek termelése (Jeong et al., 2015).

#### A Kupffer-sejtek szerepe

A májban található Kupffer-sejtek a máj szöveti makrofágjai, a mononukleáris fagocita rendszer (MPS) tagjai. Fő feladuk között tartozik a baktériumok, az idegen eredetű fehérjék és egyéb molekulák eltávolítása a vérkeringésből. Ha idegen eredetű fehérjével találkoznak, aktiválódnak, és ennek eredményeként számos citokin szabadul fel, többek között a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  és különböző típusú interleukinek. Ezek felelősek a gyulladásozó folyamat kiváltásáért, ezzel elősegítve az endotoxin vagy egyéb molekula eltávolítását. Az aktivált Kupffer-sejtek a citokinek mellett reaktív oxigénvegyületeket is termelnek, mint például szuperoxidanion gyököt és hidrogén-peroxidot (Wheeler, 2003).

A véráramba került endotoxint az LBP köti meg és szállítja a májba, ahol a Kupffer-sejtek felületén található CD14 és TLR-4 receptorkomplexhez kapcsolódik. A TLR-4 aktiválja az interleukin-1 receptor asszociált kinázt (IRAK-1), valamint további két kapcsoló fehérjét, a myeloid differenciáló faktor 88-at (MyD88) és TNF receptor asszociált faktort (TRAF). Ezek aktiválnak egy szabályozó molekulát, a nukleáris faktor-kappa B-t (NF- $\kappa$ B). Ehhez a molekulához kapcsolódik egy gátló molekula, az NF- $\kappa$ B inhibitor  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), amely inaktív állapotban van, addig amíg a korábban említett három molekula jelzésére a gátló molekula le nem válik a NF- $\kappa$ B-ről. Az aktiválódás eredményeként különböző válaszfolyamatok indulnak meg, mint például a szuperoxid-gyökök keletkezése a NADPH-oxidáz komplexen keresztül és citokinek termelődése (5. ábra) (Wheeler, 2003).



**5. ábra:** A Kupfer sejtek endotoxin hatására történő aktiválása  
(Forrás: Wheeler, 2003)

## Célkitűzés

A jelenleg zajló, sejttenyésztésen alapuló tudományos kutatások a jobban ismert és régóta használt kétdimenziós módszer mellett a folyamatosan fejlődő háromdimenziós technikát alkalmazzák. Az utóbbi módszer előnye, hogy az általa kialakított sejtcsoportok szerkezete jobban hasonlít az *in vivo* szövetek struktúrájához. Segítségével lehetőségünk van a különböző, szervezetre káros anyagok, például a Gram negatív baktériumok sejtfalát alkotó LPS és a Gram pozitív baktériumok sejtfalkomponense, az LTA által kiváltott gyulladási reakciók molekuláris szintű vizsgálatára az *in vivo* viszonyokhoz közelebb álló környezetben.

Kutatásunk célja volt, hogy összehasonlítsuk két- és háromdimenziós csirke eredetű májsejt mono-kultúrán és májsejt – nem-parenchymális sejt ko-kultúrán az LPS és LTA kezelést követő gyulladási választ, illetve a sejtek metabolikus aktivitását. Kutatásunk során 10 és 50 µg/ml koncentrációjú LPS-t, és ugyanilyen koncentrációjú LTA-t használtunk a gyulladási folyamatok kiváltásához. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszt segítségével vizsgáltuk, a tápfolyadékban jelenlévő gyulladási citokinek közül az IL-6 és IL-8 koncentrációját szendvics ELISA használatával határoztuk meg.

Célunk tehát az volt, hogy olyan csirkemáj eredetű háromdimenziós sejttenyészteteket hozzunk létre, melyeken megfigyelhetjük a gyulladási válasz létrejöttét, illetve összehasonlíthatjuk azt a kétdimenziós tenyésztetek esetében megfigyelhetővel. A jövőben további céljaink közt szerepel egyéb anyagokkal keltett gyulladási válasz vizsgálata, valamint a háromdimenziós sejttenyészteteinkben kialakított sferoidok szerkezetének részletes megismerése.



## Anyag és módszer

### **Kísérleti állatok**

A kísérlet elvégzéséhez három hetes hímivarú Ross-308 típusú hibrid brojlersirkét használtunk fel. Az állat a kísérlet elvégzésének napján érkezett az Élettani és Biokémiai Tanszékre. Munkánkat a hatályos állatvédelmi jogszabályok betartásával, a Pest megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági, Állategészségügyi, Növény- és Talajvédelmi Főosztály által kiadott, PEI/001/1431-4/2015. sz. projektengedély alapján végeztük.

### **Vegyszerek**

A kísérletekhez felhasznált vegyszereket a később leírt kivételektől eltekintve a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Louis, Missouri, Egyesült Államok) rendeltük meg.

### **Előkészületek, boncolás**

Először a boncolás során használni kívánt eszközöket sterilizáltuk és a tenyésztőedényeket a gyártó előírásai szerint I. típusú kollagénnel vontuk be. Ezt követően az alább felsorolt puffer oldatokat készítettük elő, és 40 °C-ra melegítettük őket a háromlépcsős perfúzióhoz. Az oldatokat felhasználás előtt közvetlenül 1l/perc áramlási sebességgel Carbogennel (5% CO<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub>) átbuborékolattuk.

A perfúzióhoz felhasznált oldatok a következők voltak:

1. 150 ml etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) tartalmú HANKS puffer
2. 150 ml HANKS puffer
3. 100 ml kollagenáz oldat (100 mg IV. típusú kollagenázt tartalmaz, kiegészítve 7 mmol/l CaCl<sub>2</sub>-dal és 7 mmol/l MgCl<sub>2</sub>-dal)

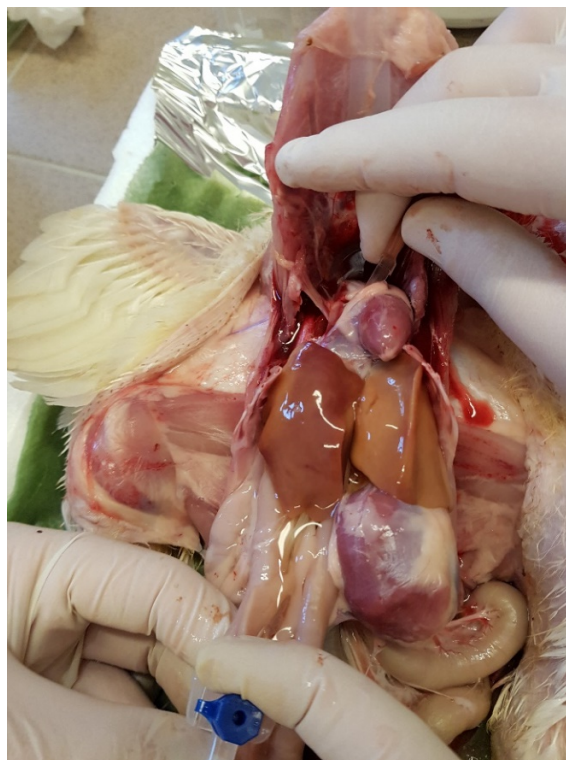
Az EGTA tartalmú HANKS puffer elkészítése során 150 ml HANKS pufferhez annyi EGTA-t adunk, hogy elérje a végkoncentráció a 0,5 mmol/l-t. Az EGTA egy kelátképző szer, amely megköti a magnézium- és kalciumionokat, ezáltal elősegíti az élő sejtek közötti kapcsolatok fellazítását, így a szövetszétesést és a sejtek izolálását könnyíti meg.

A HANKS puffer összeállítása során a HANKS törzsoldatot steril desztillált vízzel tízszeresére hígítottuk, ezt követően 4,7 ml 7,5%-os NaHCO<sub>3</sub> oldatot adtunk hozzá 1000 ml hígított pufferhez.

A következő lépésben az állatot CO<sub>2</sub> gázzal bódítottuk, majd dekapitáltuk, kivérettük és a ventrális területről a tollakat eltávolítottuk. Ezt követően az előkészített asztalra

hátfekvésben rögzítettük, a boncoláshoz szükséges terület bőrét etanollal fertőtlenítettük és tompa fejtéssel felnyitottuk. A boncolás következő lépése a *vena gastropancreaticoduodenalis* kanülálása volt, amelyhez kék vénakanült használtunk (22G). Ezen keresztül vezettük be a puffereket 30 ml/perc áramlási sebességgel. A befecskendezett folyadék elvezetéséhez szükséges egy elfolyó ág is, melynek kialakításához a szívet kanüláltuk. A jobb pitvaron egy kis metszést ejtettünk az ollóval, majd egy üvegkanült vezettünk be, és az elhasznált oldatokat ezen keresztül egy üveg főzőpohárba gyűjtöttük, kivéve a tripszines atmoszféra, mert ott egy steril üveglombikba vezettük be.

Az *in situ* perfúzió során háromlépcsős rendszert alkalmaztunk. A májat először 150 ml EGTA tartalmú HANKS pufferrel mostuk át, és vértelenítettük, majd 150 ml HANKS pufferrel, az esetlegesen ott maradó EGTA-t kimostuk, mivel a harmadik mosáshoz használt 100 ml, kollagenáztartalmú oldat csak kalcium- és magnéziumion jelenlétében képes kifejteni a hatását (6. ábra). A kollagenázoldat a sejtek közötti extracelluláris mátrix bontásáért felelős. A harmadik mosás során gyűjtőedényként egy steril tripszinező lombikot használtunk, ebbe gyűjtöttük a kifolyó kollagenáz oldatot, miközben vízfürdővel melegen tartottuk. Ezt az oldatot recirkuláltattuk, és ezt egészen addig folytattuk, amíg a májon meg nem jelent a jellegzetes szerezsendió rajzolat, ami a parenchyma szétesését jelzi. A májat, melynek burka ép maradt, ezt követően kiemeltük és steril főzőpohárba helyeztük. A további lépéseket steril fülke alatt, jégen végeztük el.



**6. ábra:** *A létrehozott perfúziós rendszer a kollagenáz oldat áramoltatása során (saját kép)*

## **A hepatociták és nem-parenchymális sejtek izolálása és a sejtenyészetek létrehozása 2D módszerrel**

A **hepatociták izolálása** steril fülke alatt zajlott. Első lépésként steril ollóval és csipesszel a Glisson-tokot felvágtuk, majd a májat 50 ml, bovine serum albuminnal (BSA) kiegészített, előzetesen Carbogennel átbuborékolgatott HANKS pufferbe helyeztük. Az így nyert sejtszuspenziót 3 réteg steril gézen keresztül szűrtük át egy 50 ml-es steril centrifugacsőbe. A szűrés során a sejtaggregátumokat és az emésztetlen interstitiumot távolítottuk el. A centrifugacsőben lévő primer sejtszuspenziót BSA tartalmú HANKS pufferben inkubáltuk jégen hűtve 50 percig, hogy a BSA segítségével meggátoljuk a sejtek összezapódását.

A sejtszuspenzióból háromlépéses centrifugálás során különítettük el a májsejteket. Elsőként a szuszpenziót BSA-val kiegészített HANKS pufferben, 3 percig 100 g gravitációs gyorsulással, majd a következő két centrifugálás során a kapott üledéket Williams' Medium E tápfolyadékkal reszuszpendálva szintén 3 percig 100 g gravitációs gyorsulással centrifugáltuk. A keletkezett felülúszót mindhárom centrifugálás után steril edénybe gyűjtöttük. Végül az üledék ismételt Williams' Medium E tápfolyadékkal történő reszuszpendálása után 20 ml májsejtekben gazdag sejtszuspenziót kaptunk. A reszuszpendálásokhoz használt tápfolyadék összetétele a következő volt:

➤ Williams' Medium E kiegészítése:

- 0,22% NaHCO<sub>3</sub>
- 50 mg/l gentamicin
- 2 mmol/l glutamin
- 5% fetal bovine serum (FBS) (kizárólag az első 24 órában tartalmazta)
- 20 NE/l inzulin
- 4 µg/l dexametazon

Ezt követően meghatároztuk a kapott sejtek életképességét és a számát tripánkékes festés és Bürker-kamra segítségével. Ehhez 200 µl tömény sejtszuspenziót 800 µl Williams' Medium E-vel hígítottuk, majd ennek 200 µl-éhez ugyanekkora mennyiségű tripánkékes festéket adtunk. A tripánkékes segítségével az élő és elpusztult sejtek számát, valamint egymáshoz

viszonyított arányát határoztuk meg. A módszer lényege, hogy a tripánkéék azokba a sejtekbe képes bejutni, amelyeknek károsodott a membránja, és így azokat kékre festi. A sejtszámlálást Bürker-kamra segítségével végeztük. Ezt követően meghatároztuk az élő sejtek és az elpusztult sejtek arányát, és mivel a kapott eredmény 90% feletti volt, a szuszpenziót a sejttenyészetek kialakítására alkalmasnak találtuk. A tömény szuszpenziót 25-szeresére hígítottuk, így  $10^6$  sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót kaptunk. A hepatocita – nem-parenchymális sejt 6:1 arányú ko-kultúrához 42 ml hepatocita szuszpenzióra és 7 ml nem-parenchymális sejt szuszpenzióra volt szükség.

A következő lépés a **nem-parenchymális sejtek** izolálása volt, melyeket legnagyobb mértékben a Kupffer-sejtek alkotják. Ezt a folyamatot a májsejtek centrifugálása során keletkezett felülúszókból végeztük. Elsőként 10 percig 350 g gravitációs gyorsulással centrifugáltuk, majd az ebből keletkezett új felülúszót egy tiszta centrifugacsőbe öntöttük át. Az új felülúszót 800 g gravitációs gyorsulással centrifugáltuk 10 percig. A kapott üledéket 5 ml Williams' Medium E-ben reszuszpendáltuk, majd meghatároztuk a sejtek életképességét és a számát az előbb ismertetett tripánkéékes festéssel és Bürker-kamra segítségével. Ebben az esetben alacsony sejtszám miatt 200  $\mu$ l sejtuszuszpenzióhoz 200  $\mu$ l Williams' Medium E-t adtunk, és ennek a hígított szuszpenziónak 200  $\mu$ l-éhez adtunk hozzá 200  $\mu$ l tripánkééket. Jelen esetben a 26 500 000 Kupffer-sejt/ml volt az eredeti koncentráció. A sejtek életképessége megfelelő volt, és ahogy a májsejtek esetében is  $10^6$  sejt/ml végkoncentrációt állítottunk be, míg a ko-kultúrához tovább hígítottuk.

A következő lépés a sejtek lerakása volt, 96-lyukú tenyésztőedényekre (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország). A kétféle sejtípust alkalmazva egyenlő sejtszámú, de a felhasznált sejtek arányában eltérő sejttenyészeteket hoztunk létre: a hepatocita mono-kultúrákat, valamint a két sejtípus kombinációjával a hepatocita-Kupffer-sejt 6:1 arányú ko-kultúrákat. A 96-lyukú tenyésztőedényen minden lyukba 100  $\mu$ l szuszpenziót mértünk. A ko-kultúrák létrehozása során először a Kupffer-sejteket raktuk le, amelyeket 20 percig 37 °C-on inkubáltunk. Ez idő alatt a Kupffer-sejtek letapadtak és egy sejthálót hoztak létre. A termosztátból kivéve leszívtuk a tápfolyadékot a sejtekről, és rámértük a megfelelő koncentrációjú hepatocita szuszpenziókat, így kialakítva a ko-kultúrákat. Ezt követően a sejttenyészeteket visszahelyeztük a termosztátba, ahol 37 °C-ot, 5% CO<sub>2</sub>-ot és közel 100% relatív páratartalmat biztosítottunk számukra.

## **A kétdimenziós sejttenyészetek kezelése**

A sejtek lerakását követő 4. órában tápfolyadékot cseréltünk, majd ettől az időponttól számolva 24 órán át inkubáltuk őket.

A sejttenyészetek kezelését a 24 órás inkubáció után kezdtük meg. A kezeléseket során *Escherichia coli* eredetű LPS-t, valamint *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-t használtunk fel gyulladáskeltés céljából. A kezelés előtt frissen készítettük el a kiegészített tápfolyadékokat, amelyek 10 és 50 µg/ml koncentrációban tartalmazták a korábban említett bakteriális sejtfalkomponenseket. A kezelést 8 órás inkubáció követte 37 °C-on.

Ezt követően a tápfolyadékot leszívtuk Eppendorf csövekbe, és ezeket -80 °C-os ultramélyhűtőbe helyeztük.

## **A hepatociták és nem-parenchymális sejtek izolálása és a sejttenyészetek létrehozása 3D módszerrel**

A 3D sejttenyésztés során a hepatociták és a nem-parenchymális sejtek izolálása a 2D módszernél ismertetett módon zajlott. A sejtek lerakását megelőzően ebben az esetben 500 000 sejt/ml-re kellett hígítani a szuszpenziókat mindkét sejtípus esetében.

A szferoidok kialakítása a mágneses nanorészecskéket tartalmazó NanoShuttle™-PL (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország) segítségével történt. A NanoShuttle™-PL vas-oxidból, aranyból és poli-L-lizinből áll, és a sejtek elektrosztatikus módon történő magnetizálásáért felelős. Nincs hatása a sejtek metabolizmusára, proliferációjára, valamint a gyulladással kapcsolatos folyamatokra sem. 5-5 ml sejtuszuszpenzióhoz 420-420 µl NanoShuttle™-t adtunk.

A következő lépés a sejtek 96-lyukú sejttaszító tenyésztőedényre rakása volt. A hepatocita mono-kultúra, illetve a hepatocita-Kupffer sejt ko-kultúra esetében is 100 µl/lyuk szuszpenziót mértünk be, amely 50 000 sejtet tartalmazott. A ko-kultúra esetében a hepatocita-Kupffer-sejt arány 6:1-re került beállításra.

Ezt követően 1 óráig 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Ez idő alatt a nanorészecskék a sejtek membránjához kapcsolódtak a poli-L-lizinen keresztül. Az inkubáció után a sejttaszító réteggel bevont tenyésztőedényt 24 órára egy szferoid drive-ra helyeztük, és inkubáltuk 37 °C-on. Egy ilyen drive-on 96 mágnes található, amelyek a tenyésztőedény valamennyi lyukának közepe alatt helyezkednek el. Ezek a mágnesek a magnetizált sejteket a lyuk közepére vonzzák, amelyek ennek következtében összetapadnak egymással és szferoidokba rendeződnek. (A

tenyésztőedény felületén található sejttaszító réteg megakadályozza, hogy a sejtek a tenyésztőedény felületéhez tapadjanak.)

## **A háromdimenziós sejttenyészetek kezelése**

Miután a 24 órás inkubáció lejárt, tápfolyadékcsere következett, amely során a szferoid drive-ról áthelyeztük a tenyésztőedényt egy úgynevezett holding drive-ra. Ez a drive úgy van kialakítva, hogy a tenyésztőedény 4-4 lyuka között egy-egy nagyobb mágnes helyezkedik el. Ez a mágnes a szferoidokat a lyuk szélére húzza és ott tartja azokat, amíg a tápfolyadékcsere zajlik. Ezt követően újabb 24 órára visszahelyeztük a szferoid drive-ra a tenyésztőedényt, amely ismét a lyukak közepére rendezte a szferoidokat, és 37 °C -on inkubáltuk őket.

Az összesen 48 órás inkubáció után holding drive használata közben eltávolítottuk a tápfolyadékot, és ráértük a sejtekre a kezelőoldatokat. A kezelés a 2D tenyésztésnél használt oldatokkal, megegyező módon zajlott. Ezt követően 24 órán keresztül inkubáltuk a szferoidokat a kezelőoldatokkal. Ezután, holding drive használata közben leszívtuk a tápfolyadékot.

## **Mérések**

### CCK-8 teszt

A tenyésztett sejtek életképességét, metabolikus aktivitásának mértékét a CCK-8 tesztrel (Cell counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, Egyesült Államok) vizsgáltuk. A CCK-8 teszt egy kolorimetriás eljárás, amely során a színintenzitás változását követjük nyomon. A CCK-8 reagens WST-8-at (Water Soluble Tetrasolium Salt) tartalmaz, amely egy színeképző anyag. A metabolikusan aktív sejtek által termelt redukált koenzimektől átvett hidrogén által a WST-8 narancssárga színű formazánná alakul át. A keletkezett formazán mennyisége egyenesen arányos a sejtek metabolikus aktivitásával, életképességével. A folyamat során keletkező formazán nem toxikus a sejtekre, így 48 órán belül újra le tudtuk olvasni, így tovább nyomon tudtuk követni a sejtek életképességének változását.

A CCK-8 teszt során a tápfolyadék leszívását követően 100 µl FBS mentes Williams' Medium E tápfolyadékot és 10 µl CCK-8 reagenst mértünk minden lyukba. Ezt követően 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az idő lejáta után 450 nm hullámhosszon olvastuk le az abszorbancia értékeket.

### Az interleukin-6 koncentrációjának meghatározása ELISA módszer segítségével

A kezelt sejttenyészetekről leszívott sejtmentes tápfolyadékok interleukin-6 (IL-6) koncentrációját csirke specifikus szendvics ELISA segítségével határoztuk meg.

A szendvics ELISA a direkt ELISA módszernél érzékenyebb, mivel kétféle ellenanyag is részt vesz a reakcióban és mindkettő specifikus a keresett antigénre. Az első ellenanyag a lemezhez kötött, ehhez kapcsolódik a kimutatni kívánt antigén. A második ellenanyag az elsőhöz rögzült antigénhez kapcsolódik és ez enzimmel jelölt (például tormaperoxidázzal vagy alkalikus foszfatázzal). Utolsó lépésként az adott enzim szubsztrátját adjuk a rendszerhez, melynek eredményeként spektrofotométerrel mérhető színreakció játszódik le. A reakció végén kialakult szín intenzitása egyenesen arányos az oldatban lévő antigén mennyiségével (Varga et al., 2018).

Mérésünk során Chicken Interleukin 6 (IL-6) ELISA Kitet használtunk, melyet a MyBioSource (San Diego, Kalifornia, USA) vállalattól vásároltuk meg. A vizsgálat során felhasznált reagenseket és oldatokat, valamint a mérés egyes lépéseit a gyártó által leírt protokoll szerint készítettük el.

#### *Az interleukin-8 koncentráció mérése*

Az interleukin-8 (IL-8) koncentrációját a sejttenyészetekről leszívott sejtmentes tápfolyadékokból csirke specifikus szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg. A szendvics ELISA és direkt ELISA közötti különbséget fentebb részleteztem.

A mérés során Chicken Interleukin 8 (IL-8) ELISA Kitet használtunk, melyet a MyBioSource (San Diego, Kalifornia, USA) vállalattól vásároltuk meg. Az oldatokat és a reagenseket, valamint a mérés egyes lépéseit a gyártó utasítása szerint készítettük el.

### **Statisztika**

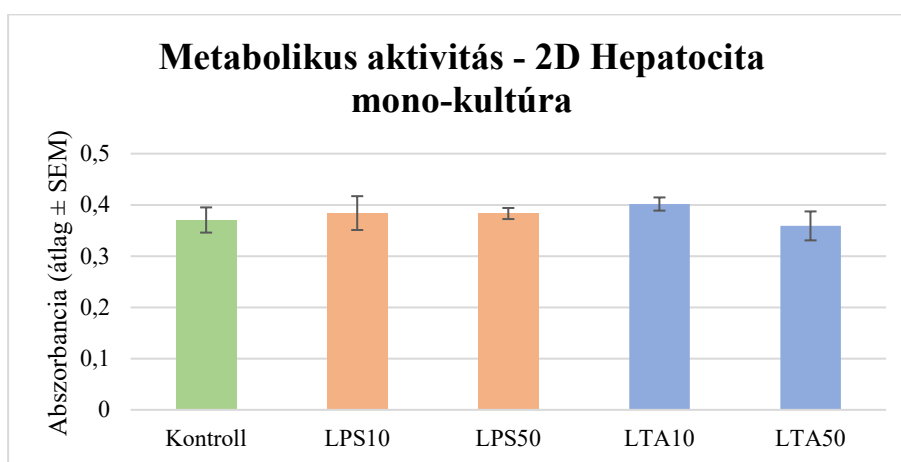
Az eredmények statisztikai elemzését R szoftverben (v. 4.0.2) végeztük. Az IL-6 és -8 koncentrációjának, illetve a CCK-8 teszt esetében az abszorbancia egyes csoportonként vett különbségének meghatározásához több-tényezős variancia analízist végeztünk. A csoportok szórásának eltérései miatt a modellt az nlme könyvtár gls függvényével illesztettük, korrigálva a csoportok varianciájára. Az illesztett modellbe a kezelés típusát, a sejttenyészet összetételét (mono-, vagy ko-kultúra), valamint annak típusát (két-, illetve háromdimenziós) vettük be magyarázó változóként. Korrigáltunk a kezeléseket és az összetételt, a kezeléseket és a típus, valamint az összetétel és a típus közötti interakcióra. A modell elemzését az anova függvénnyel végeztük. Ahol szignifikáns különbségeket találtunk, az lsmeans csomag segítségével végeztük el a páronkénti összehasonlításokat. A szignifikancia szintjét  $p \leq 0,05$ -ben határoztuk meg.

## Eredmények

Sejttenyészeink kezelése során *Escherichia coli* eredetű LPS-t és *Staphylococcus aureus* eredetű LTA-t 10 és 50 µg/ml koncentrációban alkalmaztunk. A két- és háromdimenziós hepatocita mono-kultúra és hepatocita - nem-parenchymális sejt ko-kultúra esetében azonos módon zajlott a kezelés.

### A CCK-8 teszt eredményei kétdimenziós sejttenyészet esetében

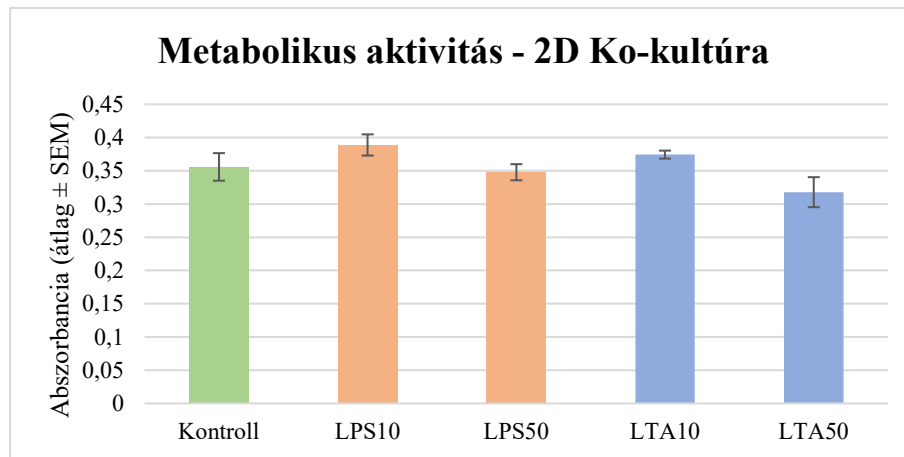
Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a hepatocita mono-kultúrák esetében a kezelések hatására a sejtek metabolikus aktivitása nem változott szignifikánsan (7. ábra).



**7. ábra:** A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására. LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást a metabolikus aktivitásban a kezeléseket követően (8. ábra)

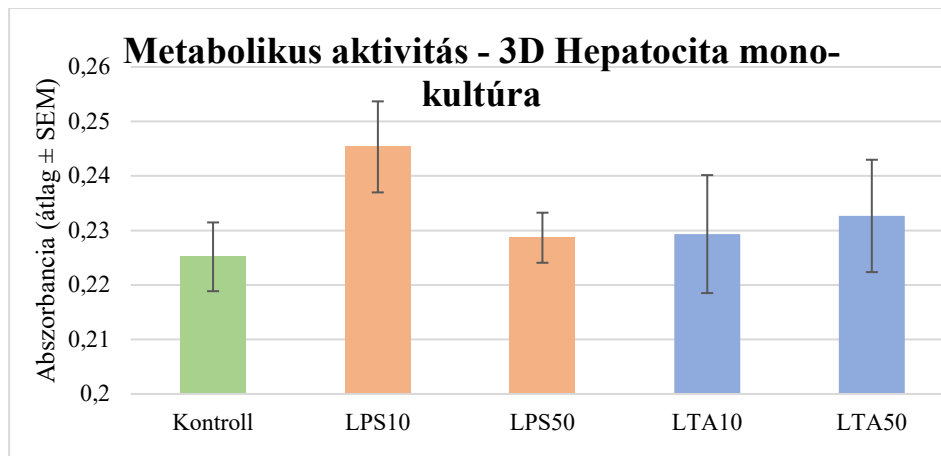




**8. ábra:** A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
*LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.*

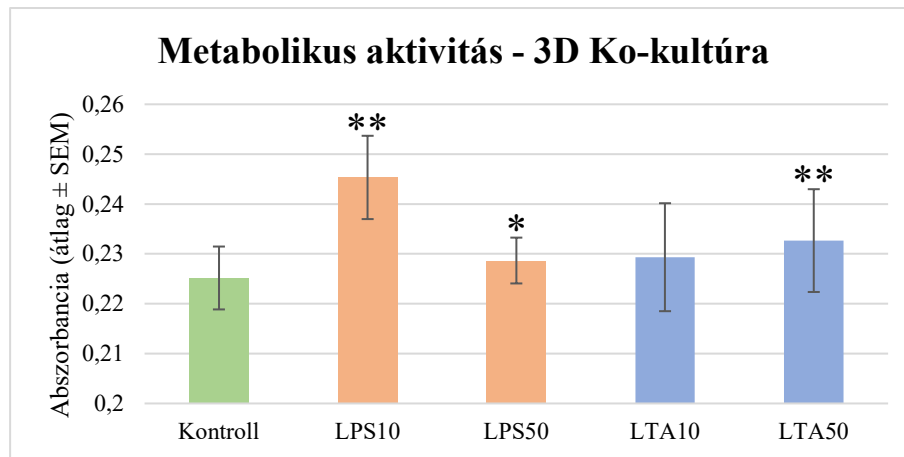
### A CCK-8 teszt eredményei háromdimenziós sejtenyészet esetében

A mérés során kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a hepatocita monokultúrák esetében a kezelésekre hatására nem változott szignifikánsan a sejtek metabolikus aktivitása (**9. ábra**).



**9. ábra:** A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita monokultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
*LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.*

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák esetében a 10 és 50 µg/ml LPS és az 50 µg/ml LTA kezelés hatására szignifikánsan ( $p=0,002$ ;  $p=0,017$ ;  $p=0,007$ ) emelkedett a sejtek metabolikus aktivitása, míg a 10 µg/ml LTA kezelés nem befolyásolta szignifikáns mértékben a sejtek metabolikus aktivitását (**10. ábra**).



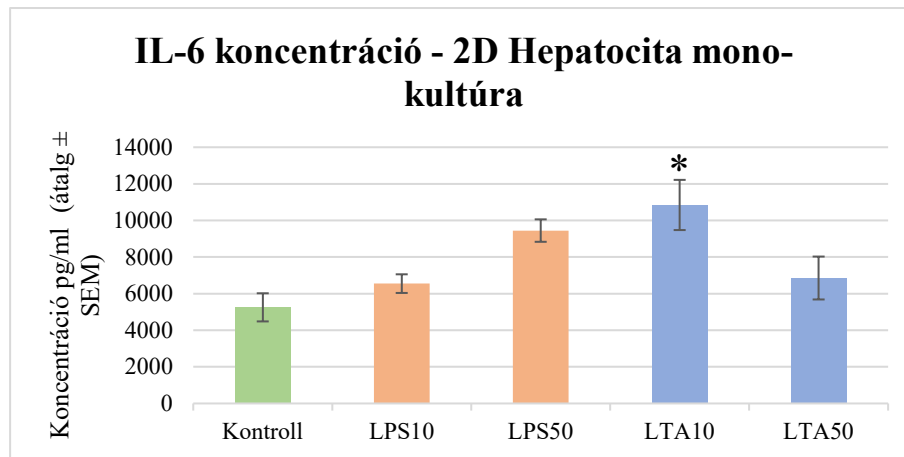
**10. ábra:** A metabolikus aktivitás mértékének változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
*LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.*  
 \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### Az interleukin termelés közti különbségek két-, illetve háromdimenziós sejtenyészetek esetében

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a kétdimenziós tenyészteinken (mono-, illetve ko-kultúráinkon egyaránt) mind az IL-8, mind az IL-6 termelés szignifikánsan magasabbnak bizonyult a háromdimenziós sejtenyészeteknél. Statisztikai elemzésünk során szignifikáns interakciót találtunk a két-, illetve háromdimenziós tenyészetek között, és a páronkénti összehasonlítás minden esetben szignifikánsnak bizonyult (minden esetben  $p < 0,0001$ ).

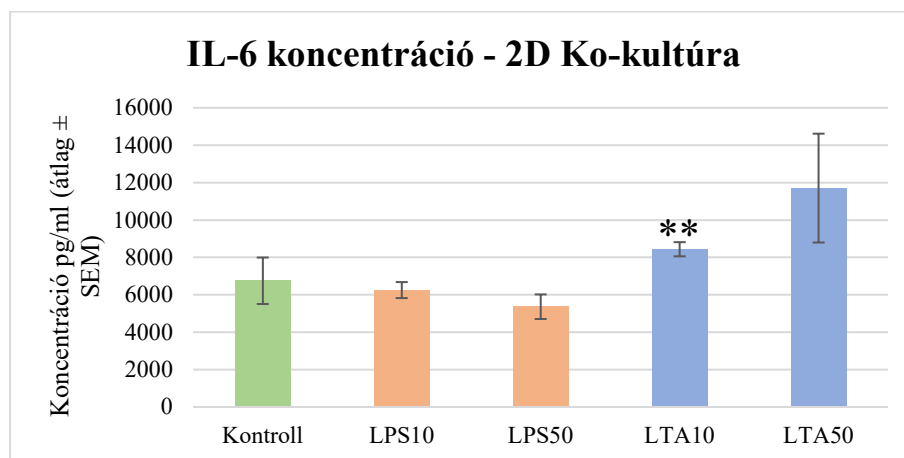
### A gyulladáscitokinek koncentráció mérésének eredményei kétdimenziós sejtenyészet esetében

A mérés eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a hepatocita mono-kultúrák esetében a 10 µg/ml LTA kezelés szignifikánsan ( $p = 0,033$ ) növelte az IL-6 termelést, míg a többi kezelés nem tudta szignifikánsan megváltoztatni az IL-6 koncentrációt (**11. ábra**).



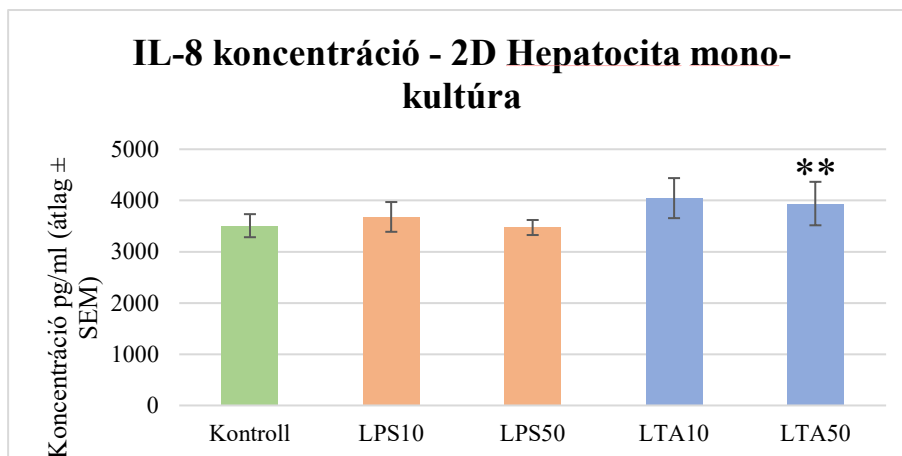
**11. ábra:** Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
*LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.*  
*\*p<0,05*

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák esetében a 10 µg/ml LTA kezelés szignifikánsan ( $p=0,001$ ) emelte az IL-6 termelést, ezzel szemben a többi kezelés szignifikáns változást nem okozott (**12. ábra**).



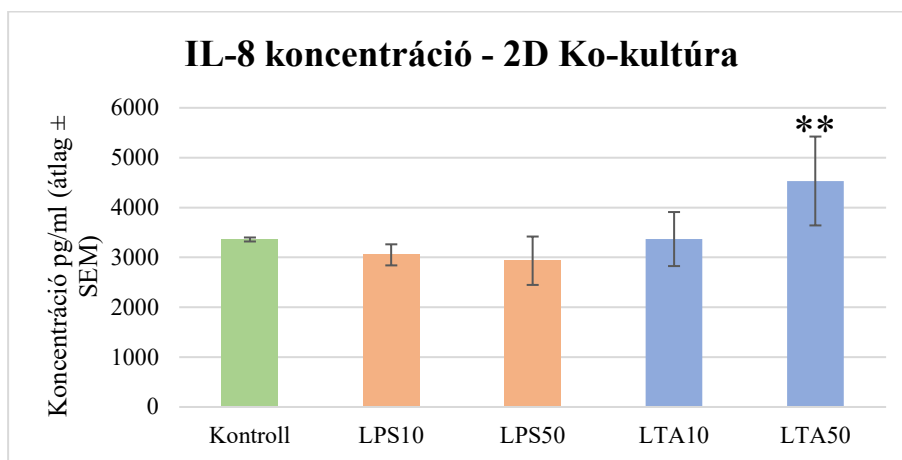
**12. ábra:** Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita - nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
*LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml.*  
*\*\*p<0,01*

Eredményeink alapján azt tapasztaltuk, hogy a hepatocita mono-kultúrák esetében az 50 µg/ml LTA kezelés szignifikánsan ( $p=0,002$ ) emelte az IL-8 termelést, ezzel szemben a többi kezelés szignifikáns változást nem okozott (**13. ábra**).



**13. ábra:** Az IL-8 koncentráció változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml. \*\* $p < 0,01$

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák esetében az 50 µg/ml LTA kezelés szignifikánsan ( $p=0,009$ ) növelte az IL-8 termelést, a többi kezelés nem okozott szignifikáns változást (14. ábra).

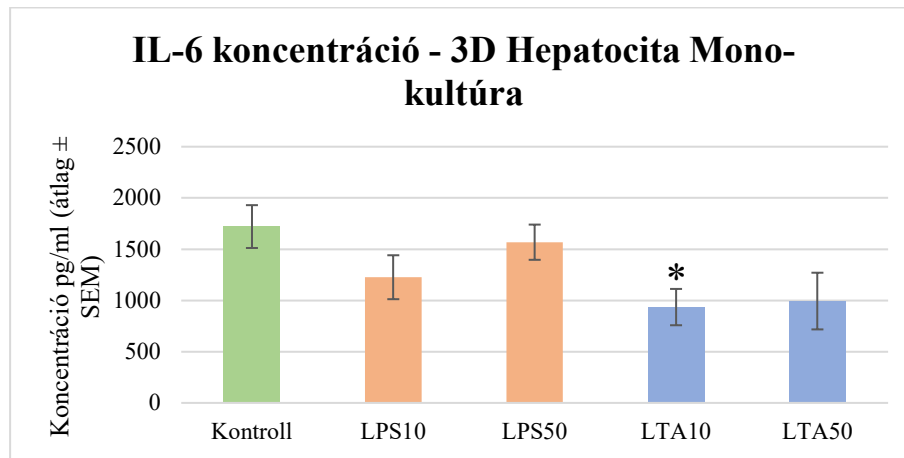


**14. ábra:** Az IL-8 koncentráció változása csirke eredetű kétdimenziós hepatocita - nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására E.LPS10 = 10 µg/ml, E.LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml. \*\* $p < 0,01$

## A gyulladáscsökkentő citokinek koncentráció mérésének eredményei háromdimenziós sejtenyésztés esetében

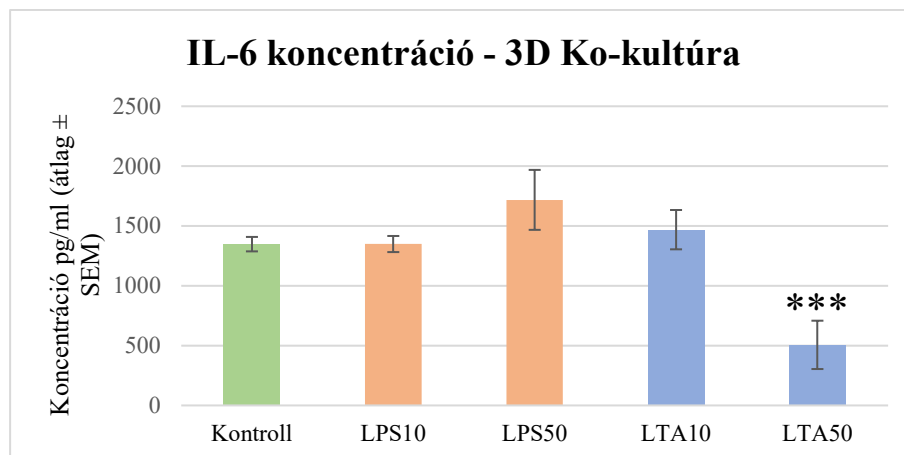
A mérés során kapott eredményeink alapján megállapítható, hogy a hepatocita mono-kultúrák esetében 10 µg/ml koncentrációjú LTA kezelés hatására szignifikánsan ( $p=0,047$ )

csökkent az IL-6 termelés, míg a többi kezelés hatására szignifikáns változást nem tapasztaltunk (15. ábra).



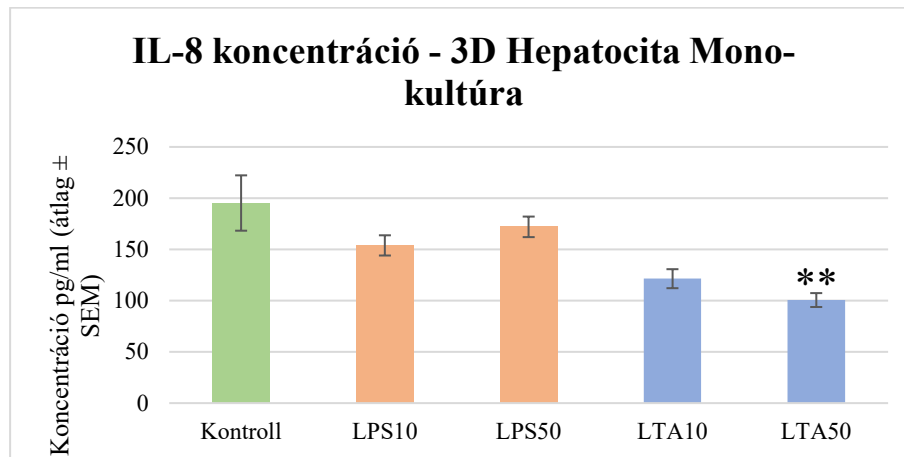
**15. ábra:** Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml. \* $p < 0,05$

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák esetében azt tapasztaltuk, hogy az 50 µg/ml koncentrációjú LTA kezelés hatására szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent az IL-6 termelés, azonban a többi kezelés nem okozott szignifikáns változást (16. ábra).



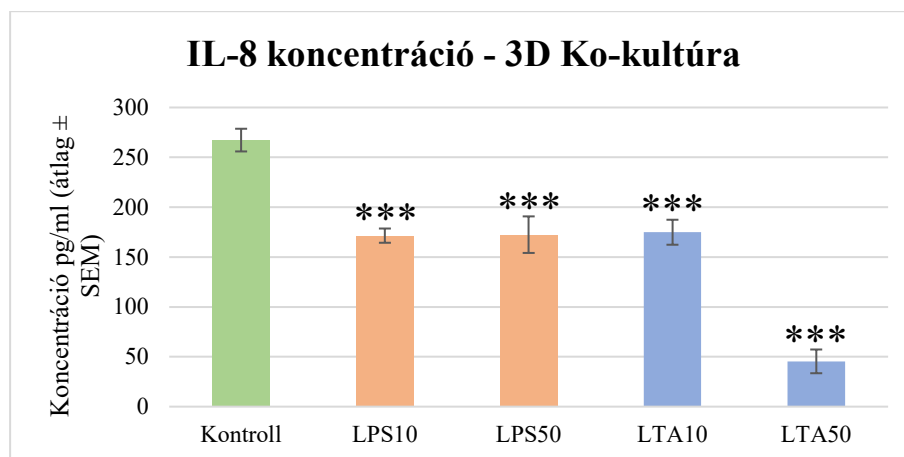
**16. ábra:** Az IL-6 koncentráció változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita - nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására LPS10 = 10 µg/ml, LPS50 = 50 µg/ml. LTA10 = 10 µg/ml, LTA50 = 50 µg/ml. \*\*\* $p < 0,001$

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a hepatocita mono-kultúrák esetében az 50  $\mu\text{g/ml}$  LTA kezelés hatására szignifikánsan ( $p=0,006$ ) csökkent az IL-8 termelés, azonban a többi kezelés nem tudott szignifikáns változást kiváltani (**17. ábra**).



**17. ábra:** Az IL-8 koncentráció változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita mono-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
 LPS10 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , LPS50 = 50  $\mu\text{g/ml}$ . LTA10 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , LTA50 = 50  $\mu\text{g/ml}$ .  
 \*\* $p < 0,01$

A hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrák kezelése során kapott eredmények alapján, megállapíthatjuk, hogy az IL-8 termelés az összes kezelés hatására szignifikánsan ( $p < 0,001$ ) csökkent (**18. ábra**).



**18. ábra:** Az IL-8 koncentráció változása csirke eredetű háromdimenziós hepatocita - nem-parenchymális sejt ko-kultúrán LPS (lipopoliszacharid) és LTA (lipoteikólsav) kezelésekre hatására  
 LPS10 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , LPS50 = 50  $\mu\text{g/ml}$ . LTA10 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , LTA50 = 50  $\mu\text{g/ml}$ .  
 \*\*\* $p < 0,001$

## Megbeszélés

Számos, az élőlényekre káros anyag válthat ki gyulladási reakciót azok szervezetébe jutva. Többek között ide sorolható a Gram negatív baktérium sejtfalában található LPS, illetve a Gram pozitív baktériumok sejtfalkomponense, az LTA, melyeknek hatásait jelenleg is aktívan tanulmányozzák *in vitro* kísérletek során. A már régóta használt kétdimenziós sejttenyészetek mellett háromdimenziós technikákat is alkalmaznak annak érdekében, hogy mélyebb betekintést nyerjenek az LPS és LTA által keltett molekuláris szintű változásokba.

Munkánk során a fent említett vegyületek által keltett gyulladási folyamatokat vizsgáltuk két-, illetve háromdimenziós csirke eredetű májsejt mono-kultúrán és májsejt-nem parenchymális-sejt ko-kultúrán. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszt segítségével határoztuk meg, ennek során azt tapasztaltuk, hogy a kétdimenziós tenyészetek esetében a sejtek lebontó aktivitásában nem mutatkozott számottevő változás, míg a háromdimenziós sejt-kultúráinknál szignifikáns emelkedést tapasztaltunk LPS és LTA kezelést követően egyaránt. A sejtek lebontó aktivitásának növekedése esetünkben valószínűleg egyfajta stresszreakciónak tekinthető: a gyulladáskeltés hatására a sejtek aktívabb állapotba kerülnek, így igyekeznek kompenzálni az őket ért káros hatásokat. A két-, illetve háromdimenziós sejttenyészetek közti különbség ebben az esetben is jól látható, hiszen szignifikáns változást csak a háromdimenziós sejt-kultúráinkon figyelhettünk meg. Ennek okát a sejtek eltérő morfológiájában és egymáshoz viszonyított helyzetében kereshetjük: a háromdimenziós sejttenyészetben élő sejtek valószínűleg jobban tudnak reagálni az őket ért hatásokra, könnyebben adaptálódnak, mivel életük jobban hasonlít az *in vivo* környezethez.

Az LPS, illetve LTA által kiváltott gyulladást két pro-inflammatorikus citokin, az IL-6 és az IL-8 koncentrációjának mérésével követtük nyomon. Megfigyeltük, hogy a kétdimenziós sejttenyészeink tápfolyadékában mért IL-6 koncentráció mintegy három-négyszer, az IL-8 szint pedig több, mint tízszer magasabb volt, mint a háromdimenziós sejt-kultúráink esetében, függetlenül az alkalmazott kezelésektől. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy e változást nem a sejtek számában vagy életképességében beállt változás okozta, hiszen a CCK-8 tesztrel mért metabolikus aktivitásban hasonló különbséget nem figyelhettünk meg.

Megfigyeléseinkkel összhangban áll Potapova és munkatársai (2007) által, humán mezenhimális őssejtek segítségével végzett kutatása is, melynek során szintén szignifikánsan kevesebbnek találták a háromdimenziós módszerrel tenyésztett sejtek IL-8 termelését, mint a kétdimenziósokét. A jelenségre valószínűleg a különböző sejttenyészetek eltérő

morfológiájában és a sejtek egymáshoz viszonyított helyzetében kereshetjük a választ, hiszen mindezen faktorok befolyással lehetnek a külső ingerekre adott válaszreakciókra. Valamint nem szabad figyelmen kívül hagyni a különböző genetikai és epigenetikai faktorokat sem. Seno és munkatársai (2018) által végzett kísérlet eredményei is bizonyítják, hogy a génexpressziós (mRNS) és fehérje szinteken sokszor különböző hatásokat tapasztalhatunk, ráadásul jelentős eltérések mutatkozhatnak a két- és háromdimenzió sejtmodellek génexpressziós mintázatában. Humán trofoblaszt sejtekkel végzett kísérletük során azt találták, hogy bár a kétdimenziós sejttenyészetek tápfolyadékában mért IL-6 koncentráció szignifikánsan magasabbnak bizonyult, az IL-6 termelésért felelős mRNS szintje azonban alacsonyabb volt, mint a háromdimenziós tenyészetek esetében. Feltételezték, hogy nem csak a korábban említett folyamatok állnak az IL-6 szekréció csökkenésének hátterében, ezért megvizsgálták a citoszkeletont alkotó aktin gyulladáson alapuló válaszban betöltött szerepét, feltételezve, hogy a csökkent aktin expresszió befolyásolhatja a sejtek gyulladásra adott válaszát. A vizsgálat során a háromdimenziós sejteket mycalolid-B-vel kezelték, amely gátolja az aktin polimerizációját, és a kezelést követően azt tapasztalták, hogy a sejt-sejt kapcsolatok csökkentek, illetve dózistól függő mértékben szignifikánsan növekedett az IL-6 szekréció. Mivel feltételezéseik szerint a szferoid struktúrába rendeződő háromdimenziós sejt-kultúrák aktintartalma magasabb, mint a kétdimenziósoké, ez a tényező is szerepet játszhat a háromdimenziós tenyészetek csökkent IL-6 termelésében (Seno et al., 2018).

Eredményeink alapján a kétdimenziós hepatocita mono-kultúra és a ko-kultúra esetében a tápfolyadék IL-6 koncentrációjában 10  $\mu\text{g/ml}$  LTA kezelést követően tapasztaltunk szignifikáns növekedést, míg az IL-8 szint a hepatocita mono-kultúráink és a ko-kultúráink esetében, 50  $\mu\text{g/ml}$  LTA kezelést követően nőtt. Ezen eredményeink alapján látható, hogy az LTA kezelés valóban gyulladást keltett kétdimenziós módszerrel tenyésztett sejtjeinkben, és ez megmutatkozott az általunk mért citokinek szintjének növekedésében is. A mért adatok azonban azt is mutatják, hogy az általunk használt LPS várakozásainktól eltérően egyik kétdimenziós sejtmodellünkön sem volt képes gyulladáson alapuló választ indukálni, a kialakított sejttenyészetek tehát nem bizonyultak érzékenynek az LPS gyulladáskeltő hatására az alkalmazott dózis és kezelési idő esetén.

A háromdimenziós mono-kultúra esetében az IL-6 koncentráció szignifikánsan csökkent 10  $\mu\text{g/ml}$  LTA kezelést követően, és szignifikánsan csökkent a ko-kultúra esetében 50  $\mu\text{g/ml}$  LTA kezelés hatására, míg az IL-8 koncentrációban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk háromdimenziós mono-kultúráink esetében az 50  $\mu\text{g/ml}$  LTA, illetve ko-



kultúráink esetében az összes kezelést követően. Ezen, a gyulladáshoz vezető folyamatokkal ellentétesen tűnő hatásokra a szakirodalmi adatok alapján számos hipotézist fogalmazhatunk meg.

Bartosh és munkatársai (2010) humán mezenhimális sztróma sejtekből (hMSC) készített tenyészetekkel végzett kutatásuk során megállapították, hogy több anti-inflammatorikus hatású fehérje génexpressziója és szekréciója fokozódott a háromdimenziós tenyészetekben a kétdimenziós sejt kultúrákhoz képest. Ezzel összhangban áll Seno és munkatársainak (2018) megfigyelése is, mely szerint a gyulladáscsökkentő hatású sztanniokalcin-1 (STC-1) peptid expressziójának szintje magasabbnak bizonyult háromdimenziós technika alkalmazása esetében a hagyományos, kétdimenziós sejttenyészetekhez képest. Ezen kívül vizsgálták az IL-6 mRNS destabilizálására alkalmas regnáz-1 nevű enzim expresszióját is, mely negatívan képes szabályozni az IL-6 termelődést, és azt tapasztalták, hogy ezen enzim fokozott aktivitást mutatott háromdimenziós sejttenyészetek esetében.

Bebizonyosodott, hogy a háromdimenziós tenyészetek már génszinten is különböznek a kétdimenziós sejt kultúráktól: Sun és munkatársai 2018-as kísérletük során humán köldökzsinór eredetű, két-, illetve háromdimenziós technikával tenyésztett humán mezenhimális őssejtek szekvenálását végezték el. Az RNS szekvenálás eredménye alapján megállapították, hogy a megfigyelt 19219 gén közül 831 gén szignifikánsan felülszabályozott volt, míg 788 gén szignifikánsan alulszabályozottnak bizonyult a háromdimenziós tenyészetben a kétdimenziós sejttenyészethez képest, és ezen gének közül számos szerepet játszik a gyulladáshoz vezető folyamatok szabályozásában.

Látható tehát, hogy egy-egy citokin koncentrációjának meghatározásából nem következtethetünk a sejtek gyulladáshoz vezető folyamatokban betöltött pontos szerepére, hiszen a pro-, illetve anti-inflammatorikus faktorok együttesen fejtik ki hatásukat, valamint fontos szerepet töltenek be a szabályozás során a különböző genetikai és epigenetikai faktorok egyaránt. Továbbá a szferoidok speciális szerkezete, az *in vivo* viszonyokat jobban közelítő struktúra, a felszínen és a sejtcsoport belsejében elhelyezkedő sejtek anyagcseréjének esetleges eltérései ugyancsak összefüggésben lehetnek az eltérő gyulladáshoz vezető reakcióval. Ennek megfelelően a jövőben tervezzük további pro- és anti-inflammatorikus citokinek vizsgálatát, valamint a háromdimenziós sejttenyészetek szerkezetének pontosabb jellemzését.

## Összefoglalás

A tudományos kutatások területén egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert a háromdimenziós sejttenyésztésen alapuló módszerek, melyek legnagyobb előnye, hogy a segítségükkel létrehozott sejtszövetek felépítése a kétdimenziós modellekhez képest jobban hasonlít az élő szövetek struktúrájához. Különösen kiemelkedő a daganatkutatásban, a gyógyszerfejlesztésben, valamint a toxikológia területén történő alkalmazásuk.

Munkánk során összehasonlítottuk a két-, illetve háromdimenziós sejttenyésztetek különféle bakteriális sejtfalkomponensekre adott gyulladási választ, valamint metabolikus aktivitását. A sejttenyésztetek kialakításához szükséges hepatocitákat és nem-parenchymális sejteket brojlercsirkéből izoláltuk, majd felhasználásukkal két- és háromdimenziós hepatocita monokultúrát és 6:1 arányú hepatocita – nem-parenchymális sejt ko-kultúrát hoztunk létre.

Sejttenyészteteinket gyulladási reakció kiváltása céljából 10 és 50 µg/ml koncentrációjú lipopoliszachariddal (LPS) és ugyanilyen koncentrációjú lipoteikólsavval (LTA) kezeltük 24 óráig. A sejtek metabolikus aktivitását CCK-8 teszttel vizsgáltuk, valamint a gyulladási citokinek közül az interleukin-6 (IL-6) és az interleukin-8 (IL-8) koncentrációját mértük a tápfolyadékban szendvics ELISA segítségével.

A CCK-8 teszt során kapott eredmények alapján a kétdimenziós sejttenyésztetek esetében a kezelések hatására a sejtek metabolikus aktivitása nem változott szignifikánsan, ezzel ellentétben a háromdimenziós sejtkultúráinknál minden kezelés során szignifikáns emelkedést tapasztaltunk.

Az IL-6 és IL-8 koncentrációk a kétdimenziós modellek esetében a kezeléstől függetlenül jelentősen magasabbnak bizonyultak, mint a háromdimenziós sejttenyésztetek tápfolyadékában. Az IL-6 koncentráció szignifikánsan növekedett a kétdimenziós hepatocita monokultúrán és a ko-kultúrán 10 µg/ml koncentrációjú LTA kezelést követően. Ezzel szemben szignifikánsan csökkent a háromdimenziós hepatocita monokultúrán 10 µg/ml LTA kezelés, valamint ko-kultúrán 50 µg/ml LTA kezelés hatására.

Az IL-8 koncentráció a kétdimenziós hepatocita monokultúrán és a ko-kultúrán az 50 µg/ml LTA kezelést követően szignifikánsan növekedett. Ezzel ellentétben a háromdimenziós hepatocita monokultúra tápfolyadékában szignifikánsan csökkent az 50 µg/ml LTA kezelést követően, továbbá a ko-kultúra esetében az összes kezelés hatására.

Eredményeink alapján látható, hogy a két-, illetve háromdimenziós sejttényészetek között jelentős különbségek fordulhatnak elő a gyulladáskeltő hatásokra adott válasz tekintetében, ami irodalmi adatok alapján feltételezhetően az eltérő génexpressziós mintázatokkal állhat összefüggésben. E különbségek minél behatóbb ismerete rendkívül fontos a sejtmódellék fejlesztése és a jövőbeli, háromdimenziós sejttényészeteket felhasználó kutatások szempontjából.

## **Summary**

Three-dimensional cell culture-based methods are gaining more importance in scientific research. The greatest advantage of these techniques is that the cells are structured in a way that is more resemble to the living tissues than we could obtain with two-dimensional cell cultures. Their applications are especially significant in the area of tumour research, medicine development and toxicology.

In the present study, the hepatocellular inflammatory response to different bacterial cell wall components was compared using two- and three-dimensional cultures. Hepatocytes and non-parenchymal cells were isolated from chicken liver, followed by the establishment of two- and three-dimensional hepatocyte monocultures and co-cultures with cell ratio of 6:1 (hepatocytes to non-parenchymal cells). Lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) were used to induce inflammation on the cell culture models, applied in 10 and 50 µg/ml concentration for 24 hours. The metabolic activity of the cells was measured by CCK-8 test, and among the inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) concentration in culture media were quantified by chicken specific sandwich ELISA tests.

According to the results of the CCK-8 assay, metabolic activity of the two-dimensional cell cultures was not changed significantly by treatment, however, significant increase was induced by each treatment in three-dimensional culture. The concentration of IL-6 and IL-8 in culture media was higher in two-dimensional models compared to three-dimensional cell cultures independently from the treatments. There was significant increase in IL-6 concentration in the two-dimensional hepatocyte monoculture after the application of 10 µg/ml LTA and in the co-culture following 10 µg/ml LTA treatment. In contrast, the same parameter was decreased in the three-dimensional hepatocyte monoculture after 10 µg/ml LTA treatment, as well as in the co-culture as a result of 50 µg/ml LTA treatment. Production of IL-8 was significantly increased in the two-dimensional hepatocyte monoculture and in the co-culture after 50 µg/ml LTA treatment. In contrast, there was a significant decrease in the IL-8 concentration in the three-dimensional hepatocyte monoculture following the application of 50 µg/ml LTA treatment. Furthermore, every treatment resulted in a decreased IL-8 concentration in the co-culture.

According to our results, there could be remarkable differences between two- and three-dimensional cell cultures in the response to pro-inflammatory effects, which observation – considering the results of other studies, carried out in three-dimensional models - could be

presumably related to differences in the gene expression patterns. The more detailed knowledge of these differences is especially important for the development of novel cell models and future research involving three-dimensional cell cultures.

## **Köszönetnyilvánítás**

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Sebők Csillának és Vörösházi Júliának, akik töretlen lelkesedésükkel, közreműködésükkel és tanácsaikkal segítettek munkámat. Hálás köszönettel tartozom Dr. Neogrady Zsuzsanna tanárnőnek és Dr. Mátis Gábornak, a Biokémiai Osztály vezetőinek, hogy bekapcsolódhattam a kutatásba. Ezen felül szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai Osztály valamennyi munkatársának a dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségéért. Dr. Mackei Máténak a kísérletek előkészítésében és elvégzésében nyújtott közreműködéséért jár a köszönet. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Papp Mártonnak a statisztikai elemzésekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért. Valamint köszönöm Dr. Bartha Tibor Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette a dolgozatom létrejöttét. Családomnak, páromnak és barátaimnak pedig köszönettel tartozom a végtelen türelmükért és támogatásukért, mellyel elősegítették a dolgozat létrejöttét.

## Irodalomjegyzék

BARTOSH, T. J., YLÖSTALO, J. H., MOHAMMADIPOOR, A., BAZHANOV, N., COBLE, K., CLAYPOOL, K., LEE, R. H., CHOI, H., AND PROCKOP, D. J. (2010): Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31). 13724-13729.

BRESLIN S., AND O'DRISCOLL, L. (2013): Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6). 240-249.

CHITCHOLTAN, K., ASSELIN, E., PARENT, S., SYKES, P. H., AND EVANS, J. J., (2013): Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Experimental Cell Research*, 319(1). 75-87.

COMLEY, J. (2017): Spheroids Rapidly Becoming a Preferred 3D Cell Culture Format. *Drug Discovery World*, Spring. 31-49. URL: <https://www.ddw-online.com/spheroids-rapidly-becoming-a-preferred-3d-cell-culture-format-1635-201704/>, Megtekintve: 2020.07.16.

DESAI, P. K., TSENG, H., AND SOUZA, G. R. (2017): Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell Culture for CYP450 Inhibition/Induction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). 1085.

DICKSON, K., AND LEHMANN, C. (2019): Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). 4341.

DUNN, J. C. Y., TOMPKINS, R. G., AND YARMUSH, M. L. (1992): Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *The Journal of Cell Biology*, 116(4). 1043-1053.

DUVAL, K., GROVER, H., HAN, L., MOU, Y., PEGORARO, A. F., FREDBERG, J., AND CHEN, Z. (2017): Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, 32(4). 266-277.

EMERMAN, J. T., AND PITELKA, D. R. (1977): Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro*, 13(5). 316-328.

GUIDET, B., BARAKETT, V., VASSAL, T., PETIT, J. C., AND OFFENSTADT, G., (1994): Endotoxemia and bacteremia in patients with sepsis syndrome in the intensive care unit. *Chest*, 106(4). 1194-1201.

HARRIS, H., WATKINS, J. F., CAMPBELL, G. L., EVANS, E. P., AND FORD, C. E. (1965): Mitosis in hybrid cells derived from mouse and man. *Nature*, 207(997). 606-608.

IVASCU, A. AND KUBBIES, M., (2006): Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(8). 922-932.

JEONG, J. H., JANG, S., JUNG, B. J., JANG, K., KIM, B., CHUNG, D. K., AND KIM, H. (2015): Differential immune-stimulatory effects of LTAs from different lactic acid bacteria via MAPK signaling pathway in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*, 220(4). 460-466.

KAPAŁCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W., ZAJĄCZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLIŹNIAK, R., ŁUCZEWSKI, L., AND LAMPERSKA, K., (2018): 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4). 910-919.

KELM, J. M., TIMMINS, N. E., BROWN, C. J., FUSSENEGGER, M., AND NIELSEN, L. K. (2003): Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2). 173-180.

MAZZOLENI, G., LORENZO, D. D., AND STEIMBERG, N. (2009): Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes & Nutrition*, 4(1). 13-22.

MUNFORD, R. S. (2005): Detoxifying endotoxin: time, place and person. *Journal of Endotoxin Research*, 11(2). 69-84.

ÖLANDER, M. (2019): Proteomic and Functional Analysis of *In Vitro* Systems for Studies of Drug Disposition in the Human Small Intestine and Liver. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy*, 272. 21. URL: <https://www.researchgate.net/publication/337049873> Proteomic and Functional Analysis of In Vitro Systems for Studies of Drug Disposition in the Human Small Intestine and Liver, Megtekintve: 2020.10.07.

POTAPOVA, I. A., GAUDETTE, G. R., BRINK, P. R., ROBINSON, R. B., ROSEN, M. R., COHEN, I. S., AND DORONIN, S. V. (2007): Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(7). 1761-1768.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C. O., TORRES-GARCÍA, S. E., OLVERA-SANDOVAL, C., RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y., MURO, A. L., AVELAR-GONZALEZ, F. J., AND GUERRERO-BARRERA, A. L. (2014): Cell Culture: History, Development and Prospects. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2(12). 188-200.

SADE, R. M. (2005): Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *The Annals of Thoracic Surgery*, 80(6). 2415-2418.

SENO, K., MUNAKATA, Y., SANO, M., KAWAHARA-MIKI, R., TAKAHASHI, H., OHKUCHI, A., IWATA, H., KUWAYAMA, T., AND SHIRASUNA, K. (2018): Aggregation of Human Trophoblast Cells into Three-Dimensional Culture System Enhances Anti-Inflammatory Characteristics through Cytoskeleton Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). 2322.

SOUZA, A. G., SILVA, I. B. B., CAMPOS-FERNÁNDEZ, E., BARCELOS, L. S., SOUZA, J. B., MARANGONI, K., GOULART, L. R., AND ALONSO-GOULART, V. (2018): Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design*, 24(15). 1689-1694.

SOUZA, G. R., MOLINA, J. R., RAPHAEL, R. M., OZAWA, M. G., STARK, D. J., LEVIN, C. S., BRONK, L. F., ANANTA, J. S., MANDELIN, J., GEORGESCU, M., BANKSON, J. A., GELOVANI, J. G., KILLIAN, T. C., ARAP, W., AND PASQUALINI, R. (2010): Three-dimensional Tissue Culture Based on Magnetic Cell Levitation. *Nature Nanotechnology*, 5(4). 291-296.

STROM, S. C., AND MICHALOPOULOS, G. (1982): Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. *Methods in Enzymology*, 82. 544-555.

SUN, Y., WANG, Y., ZHOU, L., ZOU, Y., HUANG, G., GAO, G., TING, S., LEI, X., AND DING, X. (2018): Spheroid-cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Scientific Reports*, 8(1). 2518.

TAKAHASHI, K., AND YAMANAKA, S. (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4). 663-676.

TSENG, H., GAGE, J. A., SHEN, T., HAISLER, W. L., NEELEY, S. K., SHIAO, S., CHEN, J., DESAI, P. K., LIAO, A., HEBEL, C., RAPHAEL, R. M., BECKER, J. L., AND SOUZA, G. R. (2015): A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. *Scientific Reports*, 5. 13987.

VARGA, J., RUSVAI, M., FODOR, L., (2018): A háziállatok fertőző betegségei. Budapest, Magyar Állatorvosi Kamara. 27. oldal

WHEELER, M. D. (2003): Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Research & Health*, 27(4). 300-306.

YAMADA, K. M., AND CUKIERMAN, E. (2007): Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130(4). 601-610.



**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: SZENTGYÖRGYI AKOS  
Elérhetőség (e-mail cím): ZSIGER.1999 @ GMAIL.COM  
A feltöltendő mű címe: Bakteriális regüláskomponensek kutatásának  
Ömehasonlításu. bet. -1. illetve háromdimenziós orole eredeti májpestisgénélekén  
A mű megjelenési adatai: 2020  
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrészt mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

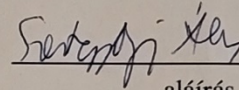


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2022. év .....<sup>11</sup>..... hó .....<sup>15</sup>..... nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

## NYILATKOZAT

Alulírott SZENTGYÖRGYI AKOS nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe Baktériális rejtalkomponensek katasztrófák összehasonlítása két-, illetve háromdimenziós csírhé eredetű májsejttranszformációkban tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2020. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2022. 11. 15.

SZENTGYÖRGYI AKOS

Szentgyörgyi Akos

a hallgató neve és aláírása