

Szakdolgozat

Hámor Fanni Zsófia

2021

Állatorvostudományi Egyetem
Élettani és Biokémiai Tanszék
Biokémiai Osztály

**Matriptáz inhibitorok hatásának vizsgálata csirke
eredetű májsejtmodelleken**

Készítette: Hámor Fanni Zsófia

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor
egyetemi docens
Dr. Barna Réka Fanni
PhD hallgató

Budapest, 2021

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
1.1 A máj felépítése és szerepe	4
1.2 A TTSP enzimcsalád.....	5
1.3 Matriptáz-2 élettani funkciója a vasanyagcserében.....	5
1.4 Patológiás matriptáz-2 működés	6
1.5 Matriptáz-1 patológiás működése	7
1.6 Matriptáz inhibitorok.....	8
1.7 3-APhA matriptáz inhibitorokkal végzett vizsgálatok emlős eredetű sejtenyészeten.....	9
1.8 3-APhA matriptáz inhibitorokkal végzett vizsgálat madár eredetű sejtenyészeten.....	12
2. Célkitűzés	13
3. Anyag és módszer	14
3.1 Kísérleti állat	14
3.2 Vegyszerek.....	14
3.3 Előkészületek, műtét	14
3.4 Kezelések, mintavételek, mérések	19
3.4.1 A sejtek metabolikus aktivitásának mérése	19
3.4.2 A tápfolyadék H_2O_2 -koncentrációjának meghatározása	20
3.4.3 A tápfolyadék IL-6- és IL-8-koncentrációjának meghatározása	21
3.5 Statisztika	22
4. Eredmények.....	23
4.1 Sejtenyészetek metabolikus aktivitásának vizsgálata.....	23
4.2 Sejtek redox állapotának vizsgálata	24
4.3 Interleukin-6 termelés vizsgálata	26
4.4 Interleukin-8 termelés vizsgálata	27
5. Megbeszélés	30
6. Összefoglalás.....	33
7. Summary	34
8. Irodalomjegyzék.....	35
9. Köszönetnyilvánítás	38

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 A máj felépítése és szerepe

A máj a gerincesek legnagyobb méretű hámszerve, tömegének túlnyomó részét hámsejtek adják. A szerv funkciója szempontjából fontos a v. *portae*-val való kapcsolata, amely a bélből felszívódott anyagokat a májba szállítja, ahonnan azok számos átalakulást követően a szisztémás keringésbe juthatnak. A máj részt vesz a felszívódott anyagok feldolgozásában, átalakításában, új vegyületek szintetizálásában, tárolásában, a szervezet számára szükséges anyagok keringésbe juttatásában. A májnak jelentős szerep jut az intermedier anyagcserében, lehetővé teszi glikogén formájában a felszívódott szénhidrátok raktározását, amit szükség esetén a szervezet számára elérhetővé tesz; végzi az egyes lipidek lebontását, felépítését és egymásba átépítését; a koleszterin és a karbamid szintézisét, illetve fontos az aminosavak anyagcseréje során. Plazma- és egyéb fehérjék, többek között különböző véralvadási faktorok, albumin, fibrinogén és transferrin szintézisét végzi, amiket később a vérkeringésbe bocsát. A májban történik a zsírok emulgeálásában szerepet játszó epesavak szintézise és szekréciója. Nélkülözhetetlen szerepe van különböző vitaminok és fémek, így a vas és a réz tárolásában. Különböző hormonok és mediátor molekulák szintézisét és módosítását végzi. Mind az exogén, mind az endogén toxikus anyagok szempontjából kiemelt szerepe van a méregtelenítésben (Röhlich, 2006).

A máj lebenyes felépítésű szerv, ezekben a lebenyekben helyezkednek el a májparenchymát alkotó májsejtek. A májsejtek, más néven hepatocyták hatszögletű hámsejtek, amelyek egymáshoz sejtkapcsoló struktúrák révén kapcsolódnak. A májsejtekben a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (dER) igen fejlett, ami utal a fehérjeszekrécióban betöltött jelentős szerepükre. Tartalék tápanyagok, többek között a glikogén raktározási helyül is a májsejtek szolgálnak (Röhlich, 2006).

A májlebenyekben belül találhatók a sinusok, amelyek finom érhalózatot hoznak létre. A sinus lumenébe benyúló csillag alakú sejtek a Kupffer-sejtek. E sejtek az endothel sejtek közé illeszkednek, viszont nem rögzítik hozzájuk sejtkapcsoló struktúrák. Fagocitáló tulajdonsággal rendelkeznek, emiatt bennük több lizoszóma és fagoszóma található. A Kupffer-sejtek a mononuclearis phagocytarendszer (MPS) tagjai, ezáltal szerepük van az idegen anyagokkal szembeni védelemben, immunválaszban (Röhlich, 2006). A májat kötőszövetes tok, Glisson-tok veszi körbe, ami kollagén- és elasztikus rostok hálójából épül fel (Röhlich, 2006).

1.2 A TTSP enzimcsalád

Az emlősök genomjának megismerését célzó vizsgálatok nagyszámú új proteolitikus enzimcsalád és új enzim felfedezését eredményezte. Az újonnan felfedezett családok közé tartozik a kettes típusú transzmembrán szerin-proteáz (TTSP) enzimcsalád. A család tagjaiban közös, hogy tartalmaznak egy N-terminális transzmembrán és egy extracellulárisan elhelyezkedő C-terminális régiót. Az extracelluláris részen található a szerin-proteáz domén és a törzsszakasz. A TTSP enzimek inaktív, egyláncú proenzimek (zimogének) formájában szintetizálódnak, és aktiválásukhoz a katalitikus domén megfelelő helyén proteolitikus hasítást igényelnek. Az aktivációt követően diszulfidhidak segítségével membránhoz kapcsolnak maradnak, a prodomént és a katalitikus domént is diszulfidhidak kapcsolják egymáshoz. Az enzimcsalád több tagja képes *in vitro* körülmények között autokatalitikus aktivációra, többek között a matriptáz-2 enzim is. Ez azt jelentheti, hogy néhány enzim a TTSP családból proteolitikus kaszkádok elindítóiként funkcionálhat. Az autokatalízis pontos lefolyása még nem ismert, de az oligomerizációhoz hasonlít. A TTSP család enzimjeinek sejtbeli lokalizációját, aktivációját, inhibícióját és szubsztrát specifitását az extracelluláris domén határozza meg. Lokalizációjukból adódóan a család tagjai szignál transzdukciót tesznek lehetővé a sejt és annak extracelluláris környezete között (Szabo et al., 2008). Ezeket az enzimeket endogén proteáz inhibitorok szabályozzák (Bugge et al., 2009).

Az enzimcsalád négy alcsaládot foglal magába, a HAT/DESC (humán légúti tripszinszerű szerin-proteáz), hepsin/TMPRSS, corin, és a matriptáz alcsaládot. A matriptáz alcsaládhoz négy enzim tartozik: a matriptáz-1, a matriptáz-2, a matriptáz-3, ezek homológ proteázok, illetve az atipikus mozaikos szerkezettel rendelkező poliszeráz-1 fehérje (Szabo et al., 2008).

1.3 Matriptáz-2 élettani funkciója a vasanyagcserében

A matriptáz-2 túlnyomórészt a magzati és felnőtt állatok májában termelődik, de termelődését kisebb mértékben kimutatták már vese, méh és az orrüreg epitheliális sejtjeiből is (Hooper et al., 2003). A matriptáz-2 elsősorban a vasanyagcsere szabályozásában játszik fontos szerepet a hepcidin transzkripció gátlásán át. A hepcidin egy főként a májban szintetizálódó peptidhormon, amely a véráramba kerülve képes eljutni, majd kötődni a membrán vasexporter fehérjéhez, a ferroportinhoz, és annak internalizációs lebomlását okozza. Mint az egyetlen ismert vasexporter fehérje, a ferroportin lebomlása képes megakadályozni a vas felszívódását a vékonybélből és felszabadulását a vasraktárakból. Számos fehérje, mint a hemokromatózis fehérje (HFE), a transferrin receptor, a

hemojuvelin és az SMAD4 faktor szabályozzák közvetetten a szervezet vasmennyiségét a Hamp gén által, ami a hepcidin kódolásáért felelős, de ezek molekuláris mechanizmusa még pontosan nem ismert (Du et al., 2008).

A Tmprss6 gén kódolja a kettes típusú szerin proteázok közül a matriptáz-2 enzimet. Knock-out egereken megfigyelték, hogy a Tmprss6 gén károsítása súlyos vashiányos anémiát okozott, mivel képtelenek voltak a hepcidinszint csökkentésére (Folgueras et al., 2008). Hasonlóan a knock out egereken végzett kísérletekhez, a Tmprss6 gén mutációjakor a humán betegeknél mikrociter anémiát diagnosztizáltak, ami kevésbé reagál a vasterápiára (Finberg et al., 2008). A matriptáz-2 csökkenti a membránhoz kötött hemojuvelin szintet, amely fehérje a hepcidin génexpressziós kofaktora (Silvestri et al., 2008). A matriptáz-2 hiány ezáltal magas membránhoz kötött hemojuvelin szintet eredményez, ami tehát a hepcidin kifejeződését támogatja. A hepcidin gátolja a vas felszívódásában részt vevő ferroportint, vashiányos anémiához vezetve (Bugge et al., 2009). Ez alapján a matriptáz-2 farmakológiai célpont lehet a szervezet vastúlterheltségének (haemochromatosis) terápiája során (Pomothy et al., 2016). Embereken és egereken végzett kutatás során egyaránt megállapították, hogy a matriptáz-2 emlősekben szükséges a megfelelő vasforgalom biztosításához (Du et al., 2008).

1.4 Patológiás matriptáz-2 működés

Mivel a TTSP enzimes családhoz sejtfelszíni proteolitikus enzimek tartoznak, így azok különböző sejt-funkciókat szabályoznak, ilyen például a tumorsejtek migrációja és a metasztázis képzés (Parr et al., 2007). A család összes tagjának szabályozatlan működését figyelték meg tumorfejlődési folyamatoknál (Velasco et al., 2002). Általánosan elmondható, hogy a daganatos sejtek fokozott vasmennyiséget igényelnek. Ennek oka feltehetően, hogy a fehérjékben a vas, mint kofaktor elengedhetetlen a sejtműködés fenntartásához és a sejtosztódáshoz (Pinnix et al., 2010). Kóros elváltozástól mentes szövetet daganatos emlőszövethez hasonlítva utóbbin jelentősen magasabb prohepcidin szintet figyeltek meg. Ez alapján transzkripciós és poszttranszkripciós folyamatok is szerepet játszanak a ferroportin csökkent koncentrációjában tumoros sejtekben az egészséges emlő sejtjeihez viszonyítva. A ferroportin génexpressziója mértékében jelentős eltérést azonosítottak az emlődaganatok egyes altípusai között, a legalacsonyabb expressziót a rossz gyógyulási kilátásokkal bíró altípus esetén állapították meg (Pinnix et al., 2010).

A matriptáz-2-t először emlőkarcinóma sejtekből írták le, valószínűsíthetően tumorszuppresszor enzimeként vesz részt a mellrák kialakulásában (Folgueras et al., 2008). Humán emlőtumorsejtek vizsgálatakor a csökkent matriptáz-2 szint korrelált a beteg rossz gyógyulási kilátásával. Ugyanezen kutatás során azt találták, hogy a daganatos sejtekben a matriptáz-2 túlzott kifejeződése szignifikánsan csökkentette a tumorigenezist CD1 csecsemőmirigyétől megfosztott egérben, továbbá csökkentette a tumorsejtek invazív és migrációs tulajdonságait. A matriptáz-2 *in vivo* körülmények között gátolta az emlődaganat fejlődését, javította az emlőtumorban szenvedő betegek kilátásait a gyógyulásra; *in vitro* a daganatos sejtek invázióját és mozgékonyágát csökkentette (Parr et al., 2007). Sanders és munkatársai (2008) daganatos prosztata sejtvonalakon vizsgálták a matriptáz-2 szerepét, és a matriptáz-2 túlexpressziója szignifikánsan csökkentette a sejtmigrációt és inváziót. A két vizsgálat eredményét együttesen értékelve arra jutottak, hogy a matriptáz-2 enzimnek szuppresszor funkciója van a sejtmigrációban és invázióban, ezek fontos tényezők a tumorok metasztázisképzésében. Tehát a matriptáz-2 enzimnek preventív szerepe lehet az említett daganattípusok kialakulásában és fejlődésében (Sanders et al., 2008).

1.5 Matriptáz-1 patológiás működése

A TTSP enzimcsalád másik jelentős tagja, a matriptáz-1 szabályozatlan működése is számos tumor kialakulásával kapcsolatban áll. Túlexpresszióját többek között emlő-, vastagbél- és prosztatacarcinóma, illetve vese- és májtumor kialakulása során figyelték meg. A legtöbb tumorfajta esetében a túlexpresszió mértékét korreláltnak találták az előrehaladott klinikopatológiás állapottal (Murray et al., 2016).

Osteoartritisszel (OA) érintett és fenotípusosan normális porcsejt minták RNS vizsgálata során az OA-val érintett porcban a matriptáz-1 jelentősen magasabb expresszióját mutatták ki (Milner et al., 2010).

A matriptáz-1-et Beaulieu és munkatársai (2013) influenzavírust aktiváló proteázként azonosították, ami a humán légzőrendszer epithéliumában képes a vírusreplikáció támogatására. A matriptáz széles pH tartományban képes a H1 vírus hemagglutininjének hasítására, míg a H2 és H3 vírusok esetében nem. Ketobenzotiazol-szerin csapdát tartalmazó szelektív matriptáz inhibitor alkalmazása jelentősen csökkentette a H1N1 vírus replikációját (Beaulieu et al., 2013). A TTSP családba tartozó, matriptáz-1 enzimmel rokon TMPRSS2 képes hasítani az influenzavírusok sejt felszíni glikoproteinjét, ez előfeltétele a vírus-sejt fúziós kapcsolat kialakulásának. Ezáltal az influenzavírus

aktivációjának megakadályozásának kulcsa a TMRSS2 gátlása lehet (Meyer et al., 2013). Az új típusú koronavírus, a SARS-CoV-2 sejtbe jutását is segítheti TMRSS2 a virális tüskefehérje (S-fehérje) hasításán keresztül. A TMRSS2 gátlására bizonyítottan képes kamosztátmezilát szerin-proteáz inhibitor részlegesen gátolta a SARS-CoV-2 sejtbe történő bejutását (Hoffmann et al., 2020).

1.6 Matriptáz inhibitorok

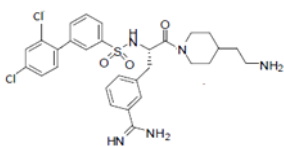
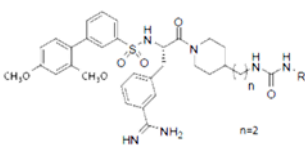
Szulfonált 3-amidinofenilalanin (3-APhA) származékot tartalmazó piperidin és piperazin inhibitorokat fejlesztettek eredetileg a tripszinszerű szerin-proteázok, mint a trombin és az urokináz gátlására. A hárombázisú 3-amidinofenilalanin származékok néhány analógiát később matriptáz-1 inhibitoroként azonosították, amelyek az extracelluláris C-terminálison található tripszinszerű szerin-proteáz domént gátolják. Magas szelektivitást és affinitást mutattak ki alacsony, nanomólos mennyiségben a matriptáz-1 iránt, így jó matriptáz-1 inhibitornak bizonyultak, miközben más szerin-proteázokat, mint a trombint nem gátolták. Ahhoz, hogy az inhibitorok matriptáz-1 gátló hatását fokozzák, ebből az inhibitor típusból új analógokat szintetizáltak. Az első generáció új analógjai a bifetil-3-szulfonil végre terminális aril gyűrűt kaptak, a C-terminális végre pedig két különböző amidesoportot szintetizáltak. Korábban is ismert volt, hogy a gyűrű különböző pontjain egyetlen klór vagy alkoxi szubsztituens növeli a gátlás hatékonyságát. A korábbi vizsgálatokat megerősítve azok az analógok, amelyek C-terminálisára még egy bázist tartalmazó 2-aminoetilpiperidint kapcsoltak, 3-6-szor hatékonyabb matriptáz-1 inhibitorok voltak, mint a monobázisos analógok. Az első generáció legerősebb matriptáz-1 inhibitorának a dibázisos 2,4-dimetoxi-származék bizonyult $K_i=1$ nmol/l értékkel, és legalább 20-szor kevésbé kötődött a vizsgált proteázokhoz. Az első generáció minden vegyülete kevésbé bizonyult hatékonynak a matriptáz-2 és a trombin gátlásában. Azonban a matriptáz-2 gátlására a leghatékonyabb vegyületnek azok látszottak, amik $K_i=350$ nmol/l és 110 nmol/l értékkel képesek a matriptáz-2 gátlására. Az általunk használt 432 sorszámú vegyület az első generáció tagja, az egyik leghatékonyabb inhibitor mind matriptáz-1-re, mind matriptáz-2-re.

A második sorozatban az inhibitorok C-terminális amidmaradékára egy töltéssel nem rendelkező karbamid származékot kapcsoltak. Ez elég rigiddé tette az inhibitorot, hogy a trombin iránti affinitása csökkenjen. Hogy ezen analógok hidrofób tulajdonságai ellenére elkerüljék a csökkent oldhatóságot, a β -alaninamid N-terminális végére fenilszulfonil csoportot szubsztituáltak. Az összes analóg alacsony affinitást mutatott az Xa faktor és a

matriptáz-2 iránt. Ebből a szériából két vegyület képes a matriptáz-2 gátlására $K_i < 1 \mu\text{mol/l}$ értékkel. A sorozat leghatékonyabb vegyülete $K_i = 8 \text{ nmol/l}$ értékkel képes a matriptáz-2 gátlására.

A harmadik sorozat monobázisos inhibitorai a második generáció leghatékonyabb tagjainak továbbfejlesztésével készültek, a karbamid helyére 2,4-dimetoxifenilt vagy 2,4-diklorofenilt kapcsoltak. Mind a négy analóg magasabb matriptáz-1 affinitást mutatott a β -alanilamid generációhoz képest, két inhibitor esetében 500-szoros volt a matriptáz-1 iránti affinitás a trombinhoz viszonyítva. A C-terminálison található aminoetil-csoport elég hosszú, hogy ne tudjon bekötni a trombin kötődési hurkához (Hammami et al., 2012). A vizsgálatunkban használt másik inhibitor, a 460 sorszámú vegyület a harmadik sorozat eleme.

A szakdolgozat alapjául szolgáló kísérletben használt matriptáz inhibitorok sorszámát Hammami disszertációja alapján használtuk (Hammami, 2012). A két használt vegyület tulajdonságait az **1. táblázat** foglalja össze.

Inhibitor sorszáma	Képlete	K_i matriptáz-1 ($\mu\text{mol/l}$)	K_i matriptáz-2 ($\mu\text{mol/l}$)	Bázikus csoportok száma
432		0,002	0,11	2
460		0,0018	0,18	1

1. táblázat Jelen szakdolgozatban vizsgált két inhibitor szerkezeti képlete, K_i értéke matriptáz-1-re, illetve matriptáz-2-re és a bázikus csoportok száma.

1.7 3-APhA matriptáz inhibitorokkal végzett vizsgálatok emlős eredetű sejtenyészeteken

Számos tumor esetében az invazív növekedés elsődleges elindítója a hepatocytá growth factor/scatter factor (HGF/SF), a másik fontos szereplő az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA). Mindkét enzim inaktív zimogén, pro-HGF/SF és pro-uPA formájában termelődik. Förbs és munkatársai (2005) eredményei alapján a matriptáz *in vivo*

és *in vitro* is kulcsszerepet játszik a pro-HGF/SF aktivációjában humán vastagbélből és prosztatából származó karcinómasejteken. A kutatásban három matriptáz inhibitorot használtak, ezek a CJ730 ($K_i=46$ nmol/l), CJ697 ($K_i=26$ nmol/l) és CJ463 ($K_i=15000$ nmol/l) voltak. A matriptáz-1 *in vitro* körülmények között hatékony pro-HGF/SF aktivátornak bizonyult. Valószínűsíthetően a matriptáz-1 közvetlenül felelős a pro-HGF/SF aktiválásáért, ezt támasztja alá a matriptáz gátlás kinetikája. Hogy sejtes közegben vizsgálják a matriptáz-1 jelentőségét a pro-HGF/SF aktivációjában, kis koncentrációban matriptáz inhibitorokat alkalmaztak. Már 1 μ mol/l-es mennyiségben alkalmazott inhibitor 50%-kal csökkentette a pro-HGF/SF átalakítást. Megállapításra került, hogy a matriptáz-1 gátlása jelentősen csökkenti a daganatos sejtek terjedését, így a matriptáz-1 a tumorsejtek invázióját gátló terápiák célpontja lehet (Förbs et al., 2005).

Szintetikus, 3-ApHA matriptáz specifikus inhibitorokat vizsgáltak egészséges hasnyálmirigy és hasnyálmirigy adenokarcinóma sejteken, hogy megismerjék a matriptáz-1 szerepét a hasnyálmirigy tumor kialakulásában (Uhland et al., 2009). A matriptáz-1 kulcsfaktora az invazív növekedés két elindítójának, a HGF-nek és az uPA-nak. Ahhoz, hogy megértsék a matriptáz jelentőségét a tumorigenezisben, vizsgálták a gátló vegyületek hatását az uPA zimogénjének termelődésére. Az egészséges sejtekhez viszonyítva a daganatos sejteken a matriptáz-1 túlprodukcióját figyelték meg. Ezt követően a daganatos sejteken vizsgálták, hogy a matriptáz-1 funkcionális szerepet tölt-e be az adenokarcinóma fejlődése szempontjából. A sejtvonalakon a matriptáz inhibitorok teljesen megszüntették a pro-uPA aktivációt és csökkentették a tumor inváziós tulajdonságát (Uhland et al., 2009).

A 3-ApHA származék inhibitorok közül a MI432 sorszámú vegyületet korábban IPEC-J2 sertés bélhámsejtvonalon vizsgálták. A kutatás arra irányult, hogy megismerjék a matriptázt gátló vegyület hatását az egyrétegű bélhámsejtek barrier funkciójára, illetve paracelluláris permeabilitására. Minél nagyobb koncentrációban volt jelen az inhibitor, annál kisebb mennyiségben volt megtalálható a matriptáz-1 a sejtmembránban, és megnövekedett a sejtek közötti átjárhatóság is. Annak ellenére, hogy a gátló vegyület rövid idejű kezelést követően növelte a reaktív oxigéngyökök (ROS) felszabadulását, hosszabb inkubáció esetén az intra- és extracelluláris H_2O_2 szint kiegyenlítődött, így az extracellulárisan mért peroxid mennyisége megegyezett a nem-kezelt sejtekével. A kutatás fontos eredménye, hogy a matriptáz gátlásával sejtenyészeten megnövelhető a paracelluláris permeabilitás (Pászti-Gere et al., 2015).

Pászt-Gere és munkatársai (2016) IPEC-J2 egyrétegű bélhámsejt kultúráján vizsgálták a matriptáz-1 gátlását. A sejtkultúra kezelését egy nem szelektív szerin-proteáz inhibitorral és sokkal szelektívebb 3-ApA származék vegyületekkel végezték. A kiválasztott 3-ApA származék vegyületek sorszámai a következők voltak: MI432, MI453, MI460 és MI463. A kutatás célja volt, hogy vizsgálják az IPEC-J2 sejtréteg áteresztőképességét a matriptáz inhibitorok jelenlétével és jelenléte nélkül, illetve, hogy a kiválasztott inhibitorok hogyan befolyásolják a matriptáz-1 aktivitását a sejtekben és a felülúszóban. A sejteket membráninzerterten tenyésztették, ami lehetővé tette az *in vivo* körülmények rekonstruálását. A szerin-proteáz inhibitoros kezelést követően a szerin-proteáz aktivitás csökkent. A 3-ApA vegyületek közül a MI432 és MI460 sorszámúakkal történt kezelés jelentősen csökkentette a transzepitheliális elektromos ellenállást az apikális és bazolaterális térrész között. A kutatás eredménye azt mutatja, hogy a matriptáz jelentős szerepet játszhat a paracelluláris permeabilitás szabályozásában IPEC-J2, illetve egyéb sejteken a sejtkapcsoló struktúrák szabályozásán keresztül (Pászt-Gere et al., 2016).

Sertés májsejt tenyészetén Pomothy és munkatársai (2016) végeztek kísérletet a matriptáz-1 és a matriptáz-2 gátlására 3-ApA származék inhibitorokkal. A dibázisos inhibitorok közül a MI432 és MI441, míg a monobázisos inhibitorok közül a MI460 és MI461-et használták. Hepatocytá - Kupffer-sejt kokultúrát vizsgáltak 6:1 és 2:1 sejtarányban, hogy a máj enyhébb és súlyosabb fokú gyulladását modellezzék. Megállapították, hogy 24 órás időtartamban biztonságosan alkalmazhatóak voltak a kiválasztott inhibitorok, anélkül, hogy jelentős sejtpusztulást okoztak volna. A 2 óráig történt inhibitoros kezelés nem okozott változást a sejtek által termelt interleukin-6 és -8 (IL-6, IL-8) gyulladásos citokinek mennyiségében, egyik sejtmódel esetében sem. A máj gyulladásos folyamatait tehát sertés eredetű sejtenyészetek esetében nem befolyásolta a matriptáz inhibitorok jelenléte (Pomothy et al., 2016).

Sertés májból készült hepatocytá monokultúráján és hepatocytá - Kupffer-sejt kokultúráján Pászt-Gere és munkatársai (2020) vizsgálták a MI432, MI441, MI460 és MI461 sorszámú 3-ApA származékú matriptáz inhibitorok farmakológiai hatását a hepcidin keresztül a vasanyagcserére. A vegyületeket 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban használták a sejtenyészeteken, és mind az IL-6, IL-8 termelés, mind az extracelluláris H_2O_2 termelés vizsgálata során 24 órás inhibitoros kezelést alkalmaztak. Az alkalmazott MI432, MI441 és MI461 számmal jelzett vegyületek esetén monokultúráján a hepcidin termelésében növekedést észleltek, ezzel szemben kokultúráján nem figyeltek meg jelentős változást a

menyiségében. E vegyületek alkalmazása terápiás jelentőséggel bírhat olyan betegségek során, ahol a túl alacsony hepcidinszint nem képes megakadályozni a vas felszabadulását, így nem tudja elkerülni a szövetek károsodását, amit a fokozott vasmennyiség okoz. A vizsgálatban részt vett vegyületek közül egyedül a MI461 volt képes *in vitro* körülmények között a hepcidin termelődését fokozni. A MI461 számú vegyülettel történt kezelés után az extracelluláris H_2O_2 mennyiségében nem történt szignifikáns változás, illetve a sejtmódellen nem növelte az IL-6 és IL-8 gyulladásos citokinek mennyiségét. Kokultúrán ennek az inhibitornak nem figyelték meg gyulladásellenes hatását (Pászt-Gere et al., 2020).

1.8 3-APhA matriptáz inhibitorokkal végzett vizsgálat madár eredetű sejtenyészeteken

A matriptázt érintő korábbi vizsgálatokat főként emlős sejteken végezték. Baron és munkatársai (2013) vizsgálták baromfi sejteken a H9N2 influenzatörzs proteolitikus aktivációját. Humán embrió- és kutya vesesejtvonalat használtak, illetve sejtenyészetet készítettek 15 napos, specifikus patogéntől mentes (SPF) csirkeembrió vesesejtjeiből. A vizsgálatához a korábbiakban már leírt MI021, MI462 és az MI701 furin inhibitort alkalmazták. Ahhoz, hogy megállapítsák, a matriptáz felelős-e a vírus proteolitikus aktivációjáért, kutya vesesejtvonalon vizsgálták a fertőzött sejtek szaporodását a MI021 vagy a MI462 inhibitorok jelenlétében. Az inhibitorok hatására csökkenést észleltek a vírus mennyiségében a kezeltlen sejtekhez képest. Csirkeembrió vesesejtjeiből készült tenyészetben a MI462 számú inhibitor hatását vizsgálták. Arra a következtetésre jutottak, hogy a matriptáz felelős a vírus terjedéséért és aktivációjáért csirke vesesejtben. A kutatás eredményeként megállapítást nyert, hogy a vizsgált három influenza izolátumból kettőt a matriptáz aktivált (Baron et al., 2013).

2. Célkitűzés

A matriptázok szerepét és működését vizsgáló korábbi kutatások elsősorban emlős sejteken zajlottak, így madarakban pontos szerepük nem teljesen tisztázott.

Emlős sejtek esetében már folytak kutatások matriptáz inhibitorokkal, mint gyógyszerjelölt vegyületekkel különböző daganatos betegségek, oszteoarthritis esetében, víruskutatásban. Madár eredetű sejtekből készült sejtmodellen ezt megelőzően csak egyetlen kutatás során alkalmaztak matriptázt gátló vegyületeket. Az emlős sejteken végzett eddigi kutatások során sok esetben csak specifikus, matriptáz enzimgátló tulajdonságaikat vizsgálták, egyéb paraméterek vizsgálata nem történt meg. Mivel a matriptáz madár májban betöltött élettani szerepének megismerésén túl a későbbiekben az inhibitor vegyületek gyógyszerként való alkalmazása a cél, így kiemelkedően fontos vizsgálnunk, hogy a májsejtekben milyen hatásokat váltanak ki *in vitro* körülmények között, hiszen a szervezetbe kerülő anyagok jelentős része a májban metabolizálódik.

Összefoglalva, kutatásunk célja a bizonyítottan matriptáz-1 és matriptáz-2 gátlására alkalmas 3-APhA vegyületek tesztelése csirke eredetű májsejt monokultúrán és hepatocytá – nem-parenchymális sejt gyulladásoos kokultúrán. Ezzel elsőként kívántuk vizsgálni a matriptáz és gátló vegyületeik esetleges funkcióját csirke májsejtek oxidatív státuszának, metabolikus aktivitásának, valamint gyulladásoos folyamatainak befolyásolásában.

3. Anyag és módszer

3.1 Kísérleti állat

Kísérleteinkhez hím 3 hetes Ross-308 brojlercsirkét használtunk. Az állatok Devecserről, nem sokkal a kísérlet megkezdése előtt érkeztek az Élettani és Biokémiai Tanszékre. A munka a hatályos jogszabályoknak megfelelően zajlott az állatokkal; mivel a sejtizolálás közvetlenül az állatok beérkezését követően megtörtént, az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának állásfoglalása értelmében nem volt szükség állatvédelmi engedélyre a kísérletek elvégzéséhez.

3.2 Vegyszerek

A 3-ApHA alapvázú matriptáz inhibitorokat Torsten Steinmetzer csoportja szintetizálta (Philipps University Marburg, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Marburg, Németország), és kaptuk meg kipróbálásra. A por formájú inhibitorokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk be, 1 mmol/l koncentrációjú törzsoldatokat hozva létre. A kísérletek előtt közvetlenül hígítottuk az adott sejttípusnak megfelelő tápoldatban az inhibitorokat.

A pufferekhez és a tápoldatokhoz használt összetevőket a Sigma-Aldrich Kft-től (München, Németország) rendeltük.

A sejtek életképességének vizsgálatához használt CCK-8 tesztet (Cell Counting Kit-8) Sigma-Aldrich Kft-től (München, Németország) szereztük be. Az extracelluláris H₂O₂ szint méréséhez szükséges Amplex Red készlet a Thermo Fisher Scientifictől (Waltham, Egyesült Államok) származott. A tápfolyadék IL-6 és -8 koncentrációját mérő enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kiteket a MyBioSource, Inc.-től (San Diego, Egyesült Államok) rendeltük.

3.3 Előkészületek, műtét

A műtét előtt előkészítettük a sejtenyésztet létrehozásához szükséges tápfolyadékot és a műtét során használt eszközöket és berendezéseket, illetve a perfúzió során használandó oldatokat. Ezen oldatok hőmérsékletét vízfürdőben 40°C-ra melegítettük és Carbogennel (95% O₂, 5% CO₂) átbuborékolgatva oxigenizáltuk. Emellett megtörtént a sejtenyésztő lemezek kollagénezése (I. típusú, patkány farokból izolált kollagén segítségével), majd lemosása foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS).

Az előkészített tápfolyadékok, mosófolyadékok és pufferek összetétele:

- Hanks-puffer (1000 ml)
 - tízszeres koncentrációjú törzsoldatot desztillált vízzel tízszeresre hígítva
 - 4,7 ml 7,5%-os NaHCO_3 oldat hozzáadása 1000 ml pufferhez
- etilén-glikol-tetraacetát (EGTA) tartalmú Hanks-puffer
 - 200 ml Hanks-puffer
 - 0,5 mmol/l EGTA $\rightarrow$ 1,052 ml EGTA törzsoldatot hozzáadva
- kollagenáz oldat
 - 100 mg kollagenáz
 - 100 ml Hanks-puffer
 - 7 mmol/l CaCl_2
 - 7 mmol/l MgCl_2
- BSA-val (szarvasmarha szérumalbumin) kiegészített Hanks-puffer
 - 50 ml Hanks-puffer
 - 1,25 g BSA
- Tápfolyadék
 - Willims Medium E
 - 0,22% NaHCO_3
 - 50 mg/l gentamicin
 - 2 mmol/l glutamin
 - 25 ml foetal bovine serum (FBS, előzőleg hő inaktivált, csak az első 24 órában legyen az oldatban)
 - 4 $\mu\text{g/l}$ dexametazon
 - 20 IU/l inzulin
- Foszfáttal pufferolt sóoldat (PBS)
 - 80 g NaCl
 - 2 g KCl
 - 14,4 g Na_2HPO_4
 - 2,4 g KH_2PO_4
 - desztillált vízzel 1000 ml oldat készítése
 - pH beállítása 7,4-re

A műtét első lépéseként történt a CO₂ gázzal túlaltatott állat dekapitálása. Ezt követően eltávolítottuk a hasi területről a tollakat és az állatot hanyatt fekvésben rögzítettük. A bőr fertőtlenítésére etanolt használtunk. Tompa fejtéssel, aszeptikusan feltártuk a coelomát. Ezt követően megkerestük a *vena gastropancreaticoduodenalis*-t és műanyag vénakanült vezetünk bele, ez alkotta a perfúziós rendszer befolyó ágát (**1. ábra**). A szív kanülálását egy apró metszéssel kezdtük a jobb pitvaron, majd üvegkanült vezetünk bele. Ez a perfúziós rendszer elfolyó ágát alkotta. Az innen kifolyó puffereket később kiöntöttük; a kollagenáz oldat egy részét steril tripszinező lombikban gyűjtöttük későbbi recirkuláció céljára.

A 3 lépcsős perfúzió sebessége végig 30 ml/perc volt. Az első atmosást 150 ml EGTA tartalmú Hanks-pufferrel végeztük, majd 150 ml EGTA-mentes Hanks-puffert használtunk. A harmadik lépcsőben 100 ml kollagenáz oldat perfúziójával történt a máj interstíciumának enzimes emésztése. Az elfolyó oldatot felfogtuk és steril tripszinező lombikban gyűjtöttük, vízfürdőbe állítottuk és folyamatosan melegen tartottuk recirkuláció céljára. A cirkuláltatás addig történt, amíg a májparenchyma szétesését tapasztaltuk.

A májat steril főzőpohárba tettük, és az ezt követő lépéseket már steril fülke alatt, jégen végeztük.

1. ábra A *vena gastropancreaticoduodenalis* kanülálása.



A sejtek izolálása

A hepatocyták és a nem-parenchymális sejtfrakciók jellemzése korábbi kutatás során áramlási citometria és immunfluoreszcens festés segítségével történt. A hepatocyták

fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált antitestet alkalmazva, a nem-parenchymális sejtfrakciót pedig makrofág-specifikus fikoeritrinnel konjugált antitestet alkalmazva kerültek kimutatásra. A hepatocyták jelenléte igazolható volt frissen izolálva és 48 óra tenyésztést követően is. Az izolált és tenyésztett nem-parenchymális sejtek többségét pozitívan festette a makrofág-specifikus fitoeritrinnel konjugált antitest, amely igazolta, hogy a nem-parenchymális sejtfrakció főként makrofágokból áll, de más nem-parenchymális sejttípusok, mint a stellát- sejtek vagy biliáris endotheliális sejtek jelenléte nem zárható ki. A jelen kutatásunkban használt sejttizolálási technikát, sejtfenntartást a Tanszék munkatársai által korábbi publikációban leírt módszerrel megegyezően végeztük (Mackei et al., 2020).

A máj Glisson-tokját steril ollóval és csipesszel felvágtuk, majd már korábban Carbogennel átbuborékolgatott 50 ml BSA-val kiegészített Hanks-pufferbe helyeztük. Az így nyert szuszpenziót három réteg steril gézen keresztül szűrtük 50 ml-es steril centrifugacsőbe. A primer sejtszuszenzió inkubálása BSA-val kiegészített HANKS-pufferben történt 40-50 percen keresztül, jégbe hűtve.

Sejtek mosása, hepatocyták izolálása

BSA-val kiegészített Hanks-pufferben mostuk a sejteket, és 3 percig 100 g gyorsulással centrifugáltunk. Ezt követte kétszeri átmosás Williams Medium E-ben, és centrifugálás szintén 3 percig 100 g-n. Az üledéket Williams Medium E-ben reszuszpendáltuk úgy, hogy nagyjából 20 ml tömény szuszpenziót kapjunk.

Életképesség és összes sejtszám meghatározás

A sejtek életképességét és a sejtszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg fénymikroszkóp alatt, tripánkékes festést alkalmazva a tömény szuszpenzió 200 µl-éhez 800 µl Williams Medium E-t adtunk, majd e hígított szuszpenzió 200 µl-éhez azonos arányban tripánkéket mértünk. A hígításra azért volt szükség, hogy a sejteket sűrű elhelyezkedésük ellenére is vizsgálni tudjuk. A tripánkék olyan sejtekbe képes bejutni és azokat kékre színezeni, amelyek membránja károsodott; így lehetővé teszi az ép, élő sejtek és az elpusztult sejtek elkülönítését és ezek arányának meghatározását.

A tömény sejtszuszenzió hígítása a sejtszámnak megfelelően történt. Ez azt jelentette, hogy a hepatocyta monokultúrához 10^6 /ml-re, a hepatocyta - Kupffer-sejt 6:1 arányú kultúra készítéséhez ezt további 1,2-szeresére hígítottuk.

Nem-parenchymális sejtek izolálása differenciáló centrifugálással

A hepatocyták izolálásakor kapott felülúszókat további 10 percig centrifugáltuk 350 g gyorsulással. Az így kapott felülúszókat ismételen 10 percig, immár 800 g-n centrifugáltuk tovább. A kapott üledéket 5 ml Williams Medium E-ben reszuszpendáltuk. Ezt követően négyszeres hígításban alkalmaztunk tripánkékes festést: 200 µl szuszpenziót 200 µl Williams Medium E-ben hígítottunk, majd ennek 200 µl-éhez szintén 200 µl tripánkéket adtunk. Ezután Bürker-kamrában vizsgáltuk a sejtszámot és a nem-parenchymális sejtek életképességét, amelyek főként Kupffer-sejtek voltak; ebben az esetben is 10^6 /ml végkoncentrációra történt a hígítás. A kokultúra készítéséhez ezt kétszeresére tovább hígítottuk.

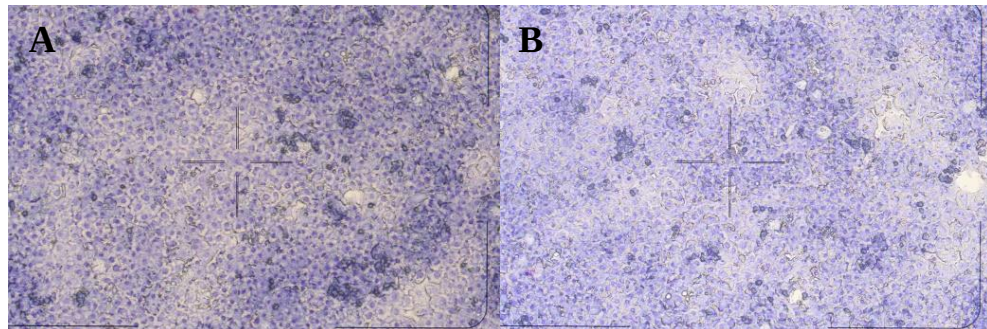
A sejtek lerakása

A hepatocyta monokultúra létrehozásához 1,5 ml hepatocyta szuszpenziót pipettáztunk a 6 lyukú Greiner 6-well plate típusú, TC felületkezelte tenyésztőedényekre lyukanként, amelyek felületét korábban kollagénnel vontuk be. A 96 lyukú lemezek lyukaiba egyenként 100 µl szuszpenziót pipettáztunk.

A hepatocyta - Kupffer-sejt kokultúrához a 6 lyukú lemez minden lyukába 1,5 ml kétszeresére hígított nem-parenchymális sejt szuszpenziót pipettáztunk, 20-30 perc elteltével a felülúszót leszívtuk. Ezt követően pedig 1,5 ml 1,2-szeresére hígított hepatocyta szuszpenziót pipettáztunk minden lyukba. A 96 lyukú edények lyukaiba rendre 100 µl szuszpenziókat pipettáztunk.

A lerakott sejteket steril termosztátban 37°C hőmérsékleten, 5% légköri CO₂-koncentráció és közel 100% relatív páratartalom mellett tenyésztettük. Az első tápfolyadékcsere a lerakás után 4 órával került sor. 24 óra inkubációt követően a hepatocyta monokultúrák és hepatocyta – Kupffer-sejt kokultúrák összefüggővé váltak (**2. ábra**), és készen álltak a kezelésekre.

2. ábra A hepatocyták monokultúrák (A) és a hepatocyták – Kupffer-sejt kokultúrák (B) Giemsa festése 48 órás tenyésztést követően 20-szoros nagyításban. (kép forrása: Barna et al., 2021).



3.4 Kezelések, mintavételek, mérések

A kezelőoldatokat a kezelés megkezdése előtt frissen készítettük el. A kísérletben használt mindkét gátlószert, az MI432 és MI460 inhibitort egyaránt 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk. A kezelést követően 4, majd 24 órával mintát vettünk a 6 lyukú edényeken tenyésztett sejtek tápfolyadékából. A 24 órás mintavétel után a sejteket emlős fehérjekivonó reagens (M-PER) puffer felhasználásával (50 $\mu\text{l/lyuk}$) lizáltuk. Hogy az eredményeket standardizáljuk, a sejtlizátumok összfehérje-koncentrációját Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Egyesült Államok) segítségével mértük. A mérések során a sejtek összfehérje-koncentrációjával standardizáltuk az eredményeket. A tápfolyadékból vett mintákat és a sejtlizátumokat további vizsgálatokig -80°C -on tároltuk. A metabolikus aktivitás nyomon követésére szolgáló CCK-8 tesztet is 4 és 24 óra inkubációt kövözően végeztük el közvetlenül a 96 lyukú lemezekben készített sejtenyészeten.

3.4.1 A sejtek metabolikus aktivitásának mérése

A CCK-8 teszt érzékeny, kolorimetriás és kvantitatív meghatározást tesz lehetővé az életképes sejtek metabolikus aktivitásának és proliferációjának vizsgálatára. A próba során a 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazolium, nátrium só (WST-8) vízoldható formázán festéket képez bioredukcióval, elektronszállító 1-metoxi fenazinium metilszulfát (PMS) jelenlétében. A módszerrel tehát az aerob lebontó folyamatok során keletkezett redukált koenzimek mennyiségét határozzuk meg, amely jó indikátora a sejtek katabolikus aktivitásának. A metabolikusan aktív sejtek által termelt redukált koenzimekről átvett hidrogén ugyanis redukálja a WST-8-at narancssárga formazánná. Mivel a CCK-8 oldat rendkívül stabil és alacsony citotoxicitással bír, így lehetővé teszi a

hosszabb, 24-48 órás inkubálási időt is, így megvalósítható az életképesség változásának tartós nyomon követése. A tesztet a 96 lyukú lemezekben tenyésztett sejtekkel végeztük el. A CCK-8 életképesség vizsgálat elvégzéséhez a 96 lyukú lemezekről leszívtuk a tápfolyadékot, ezt követően 100 µl Williams Medium E-t, majd 10 µl reagenst mértünk minden lyukra. 2 óra inkubációt követően a minták abszorbanciáját 450 nm-en Multiskan GO 3.2 readerrel mértük.

3.4.2 A tápfolyadék H_2O_2 -koncentrációjának meghatározása

A sejtek által termelt H_2O_2 extracelluláris koncentrációját Amplex Red (Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit) módszerrel mértük, gyári reagenskészlet segítségével. Az Amplex Red reagens a peroxidáz egyik legjobb fluorogén szubsztrátja, a H_2O_2 jelenlétének igazolására nagyon érzékeny és biztos módszer. Tormaperoxidáz jelenlétében az Amplex Red 1:1 sztöchiometrikus arányban reakcióba lép a H_2O_2 -vel, és nagyfokú fluoreszcenciát mutató oxidációs termék, rezorufin képződik. A rezorufin emissziójának maximuma megközelítőleg 571 és 585 nm között található, és mivel a kioltási együttható igen magas, az emisszió fluorometrián és spektrofotometrián mérhető. A módszer kevesebb, mint 10 pmol H_2O_2 kimutatására alkalmas 100 µl térfogatban. A munkánk során az inhibitoros kezelést követően a 6 lyukú edényekről leszívott tápfolyadékot -80°C -on tároltuk a mérések későbbi elvégzéséig, majd a mintákat jégen kiolvastottuk. Az Amplex Red hidrogén-peroxid/peroxidáz tesztkészlet 5 fiola Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) reagenst (fiolánként 154 µg-t), 700 µl DMSO-t, 5X reakció puffert (28 ml 0,25 mol/l-es nátrium-foszfát, pH 7,4) és 10 egység tormaperoxidázt (HRP), illetve 200 µl 3%-os hidrogén-peroxidot tartalmazott. Az Amplex Red törzsoldat elkészítése során egy fiola Amplex Red reagenshez 60 µl DMSO-t adtunk. Az 1X reakció puffer készítése során az 5X reakció pufferből 4 ml-t adtunk 16 ml desztillált vízhez; a 10 U/ml tormaperoxidáz törzsoldatot úgy állítottuk elő, hogy a 10 egység tormaperoxidázt 1,0 ml 1X reakció pufferben oldottuk fel. A 3%-os H_2O_2 22,7 µl-jét 977 µl 1X reakció pufferben feloldva készítettük el a 20 mmol/l H_2O_2 munkaoldatot. Az Amplex Red munkaoldat elkészítése során 50 µl Amplex Red törzsoldathoz 100 µl tormaperoxidáz törzsoldatot és 4,85 ml 1X reakció puffert adtunk. A H_2O_2 standard sor elkészítéséhez 7 db 1,5 ml-es Eppendorf csövet használtunk. A H_2O_2 munkaoldatból 1 µl-t adtunk 1 ml tápfolyadékhoz, így 20 µmol/l-es koncentrációt kaptunk. Ebből 250 µl-hez 750 µl tápfolyadékot adva 5 µmol/l-es koncentrációt kaptunk. Az előző Eppendorfból 800 µl-hez 200 µl tápfolyadékot adva a koncentráció 4 µmol/l lett, ebből 750 µl-hez 250 µl tápfolyadék adásával pedig 3 µmol/l-es

oldatot kaptunk. Az előző csőből vett 666 μ l és 333 μ l tápfolyadék 2 μ mol/l-es koncentrációt eredményezett. A 2 μ mol/l-es standardból vett 500 μ l és 500 μ l tápfolyadék adta az 1 μ mol/l-es standardet. A 0 μ mol/l-es koncentrációjú standard 1000 μ l tápfolyadékot tartalmazott.

A 96 lyukú edény lyukaiba bemértünk a mintákból, a standardeből és a kontrollokból 50-50 μ l-t, és mindegyikre 50 μ l Amplex Red/tormaperoxidáz munkaidőoldatot. Ezt 30 perces szobahőmérsékletű inkubálás követte fénytől védett helyen. Az inkubációs idő letelte után rögtön mértük a minták fluoreszcencia intenzitását 560 nm gerjesztési és 590 nm kibocsátási hullámhossz beállításokkal (Victor X2 2030 multilabel reader segítségével).

3.4.3 A tápfolyadék IL-6- és IL-8-koncentrációjának meghatározása

A hepatocita monokultúra és a hepatocita - nem-parenchymális sejt kokultúrák tápfolyadékából szendvics ELISA módszerrel fajspecifikusan mértük az IL-6 és IL-8 koncentrációját. Ez a módszer alkalmas csirke szérumból, plazmából és sejtenyészet felülúszójából a természetes és a rekombináns IL-6 és IL-8 kvantitatív kimutatására. A módszer dupla-szendvics technikát alkalmaz, az előre kötött ellenanyag csirke IL-6/IL-8 monoklonális ellenanyag, a detektáló poliklonális ellenanyag biotinnal jelölt. A mintákat és a biotinnal jelölt ellenanyagot az ELISA lemez lyukaiba történő pipettázást követően PBS-el kimostuk, majd az avidin-peroxidáz konjugátumot rendre a lemez lyukaiba pipettáztuk. A reagens PBS-el történő kimosása után 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) szubsztrátot kell alkalmazni a színezéshez. A TMB peroxidáz jelenlétében kék színű, sav hatására sárga színűvé változik.

A munkánk során használt csirke IL-6 és IL-8 ELISA tesztkészlet metodikája ugyanaz volt, így csak az IL-6 ELISA lépéseit mutatom be részletesen. Az inhibitoros kezelést követően a 6 lyukú edényekről leszívott tápfolyadékot -80°C-on tároltuk a teszt elvégzéséig. Első lépésben előkészítettük a mosó puffert, a koncentrált mosó folyadékot hígítottuk bidesztvízzel. Ezt követően történt az IL-6 standardok előkészítése, 1 ml oldószert adtunk a liofilizált csirke IL-6 fiolához, és 30 percet várakoztunk. Ezt követően további 7 cső mindegyikébe 300 μ l oldószert mértünk. A törzsoldatból kimértünk 300 μ l-t a második csőbe, a másodikból a harmadikba, míg elkészült a hét tagú hígítási sor. A nyolcadik cső a negatív kontroll volt, amibe csak oldószer került. Kivettük a kitet a fagyasztóból, amely 20 perc alatt szobahőmérsékletet vett fel. A blank lyukak kihagyásával bemértük az edény lyukaiba a 100 μ l-t a mintákból és az IL-6 standardokból. A lemezt ezután 90 percig 37°C-on inkubáltuk. 30 perccel a használatot megelőzően elkészítettük az IL-6 antitesteket, 1:100

arányban hígítottuk a koncentrátumot a saját oldószerükkel. Lyukanként 350 µl PBS-sel mostuk a lyukakat, majd 30 másodperc elteltével szárazra ráztuk és egyszer megismételtük a mosást. Következő lépésben a lemez lyukaiba 100 µl IL-6 antitestet mértünk, a lemezt lezártuk, és 60 percig 37°C-on inkubáltuk. Az enzim-konjugátumot 30 perccel a használat előtt készítettük el, a koncentrátumot 1:100 arányban hígítottuk a saját hígító oldatával. Az inkubálást követően háromszor mostuk a lyukakat PBS-sel, lyukanként 350 µl-rel, 30 másodpercet várahoztunk, majd a lyukakat szárazra ráztuk. Ezt követően a blank lyukak kivételével bemértük az enzim-konjugátumot, lyukanként 100 µl-t. Az edényt lezárva 30 percig 37°C-on inkubáltuk. A következő lépésben a lemez lyukait ötször mostuk 350 µl PBS-sel, majd 30 másodperc várahozást követően szárazra ráztuk. A Colour Reagent A és B 9:1 arányú keverékét bemértük a lemez minden lyukába, lyukanként 100 µl-t. Ezután 37°C-on addig inkubáltuk a lemezt, amíg a magas koncentrációjú standard sötét, kék színű nem lett. Hozzáadtuk minden lyukhoz a Colour Reagent C-t és jól összekevertük. A leolvasás az utolsó lépést követően 10 percen belül történt, 450 nm-en.

3.5 Statisztika

A sejttenyészetek létrehozásához egy egyedet használtunk. Egy 6 lyukú lemez minden lyuka alkotta a hepatocita monokultúra kontrollt, egy másik edény minden lyuka a kokultúra kontrollt. Egy kezelési csoportból három párhuzamos lyukat készítettünk a 6 lyukú lemezekben. A 96 lyukú edényben 6 párhuzamos lyuk alkotta a hepatocita monokultúra és a kokultúra kontrollt, a kezelési csoportokat 3 párhuzamos lyukon vizsgáltuk.

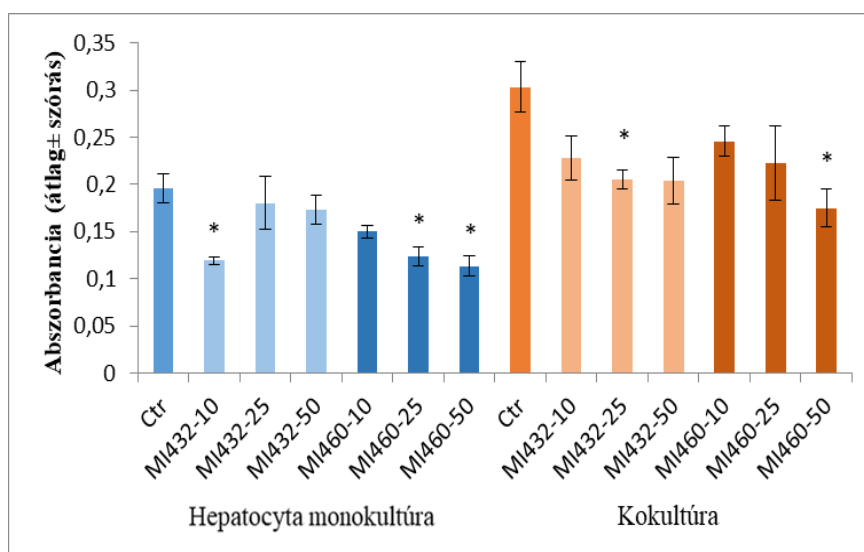
A kapott eredmények kiértékelését R 2.14.2 statisztikai szoftver segítségével végeztük. Az átlagok közötti különbségek becsléséhez egyutas ANOVA-t használtunk. Szignifikánsnak tekintettük az eltérést, amennyiben a p-érték 0,05-nél kisebb volt, ezeket az ábrákon csillag jelöli (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Az eredményeket átlag ± standard hiba alakban tüntettük fel.

4. Eredmények

4.1 Sejttenyészetek metabolikus aktivitásának vizsgálata

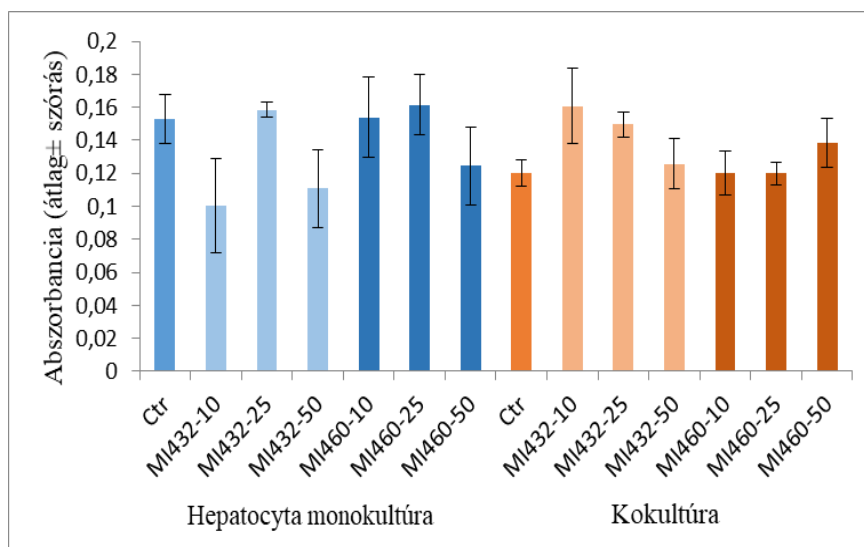
A sejttenyészetek metabolikus aktivitását az inhibitoros kezelést követően a hepatocytá monokultúrán és hepatocytá - Kupffer-sejt kokultúrán egyaránt 4 és 24 óra elteltével CCK-8 teszttel végeztük. A rövidebb, 4 órás kezelés során mindkét inhibitor bizonyos koncentrációkban, mono- és kokultúrán egyaránt csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását a kontroll csoporthoz képest. Szignifikáns hatása ($p < 0,05$) monokultúrán a MI432 sorszámu inhibitor 10 $\mu\text{mol/l}$, illetve a MI460-as vegyület 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációja esetében mutatkozott. Kokultúrán a MI432 vegyület 25 $\mu\text{mol/l}$, és a MI460 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció okozott szignifikáns eltérést a kontroll csoport átlagához viszonyítva (**3. ábra**).

3. ábra CCK-8 teszttel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása 4 óra kezelés után a sejtek metabolikus aktivitására Az adatok ábrázolása abszorbancia átlag $\pm$ SEM történt; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$; $*p < 0,05$.



A hosszabb, 24 órás kezelést követő életképesség vizsgálatokor egyik sejttenyészetén sem tapasztaltunk az inhibitorok hatására jelentős eltérést a sejtek metabolikus aktivitásában (**4. ábra**).

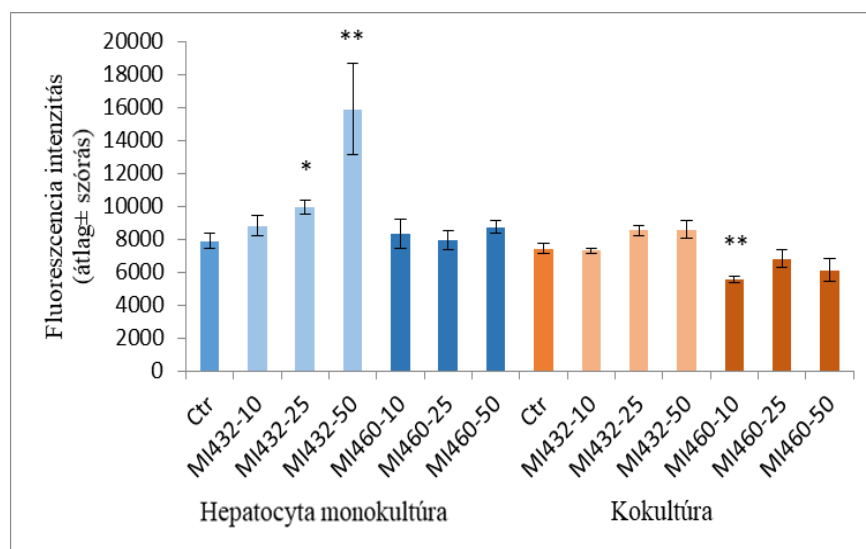
4. ábra CCK-8 tesztel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek életképességére 24 órás inhibitoros kezelést követően. Az adatok ábrázolása abszorbancia átlag $\pm$ SEM történt; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$.



4.2 Sejtek redox állapotának vizsgálata

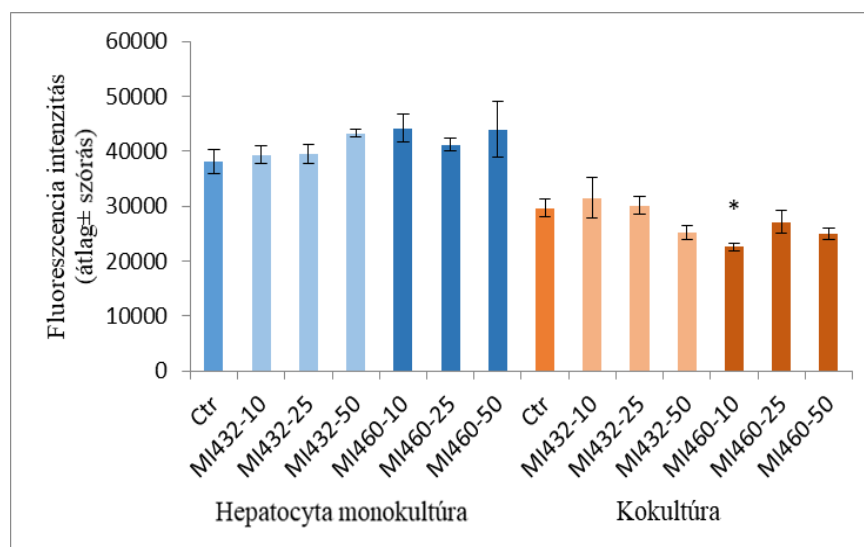
A sejtek által termelt extracelluláris H_2O_2 mennyiségét Amplex Red módszerrel vizsgáltuk mind monokultúrán, mind kokultúrán 4 és 24 óra inkubálási időt követően. Az extracelluláris H_2O_2 mennyiségében nem találtunk lényeges eltéréseket, ez alól kivétel a rövid idejű kezelést követően végzett vizsgálat esetében monokultúrán a MI432 sorszámu vegyület 25 ($p < 0,05$) és 50 $\mu\text{mol/l}$ -es ($p < 0,01$) koncentrációja, melyek szignifikánsan növelték a ROS mennyiségét. Ezzel szemben kokultúrán a MI460-as inhibitor 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációja szignifikáns csökkenést eredményezett (**5. ábra**).

5. ábra Amplex Red módszerrel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek redox állapotára 4 óra kezelést követően. Az adatokat fluoreszcencia intenzitás átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$;
* $p<0,05$, ** $p<0,01$.



A hosszabb idejű, 24 órás kezelés esetében végzett vizsgálat során kokultúrán a 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott MI460 sorszámú vegyület okozta az extracelluláris H_2O_2 mennyiségének szignifikáns ($p<0,05$) csökkenését (**6. ábra**).

6. ábra Amplex Red módszerrel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek oxidatív státuszára 24 óra kezelést követően. Az adatokat fluoreszcencia intenzitás átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$;
* $p<0,05$.

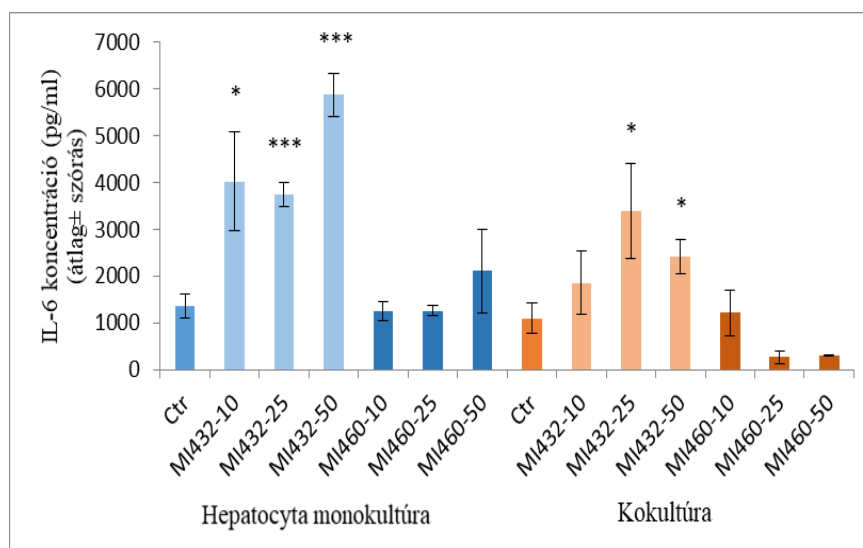


4.3 Interleukin-6 termelés vizsgálata

Az IL-6 gyulladásos citokin mennyiségének méréséhez szendvics ELISA módszert alkalmaztunk. A vizsgálatot mindkét esetben az inhibitoros kezelést követően 4 és 24 órával végeztük.

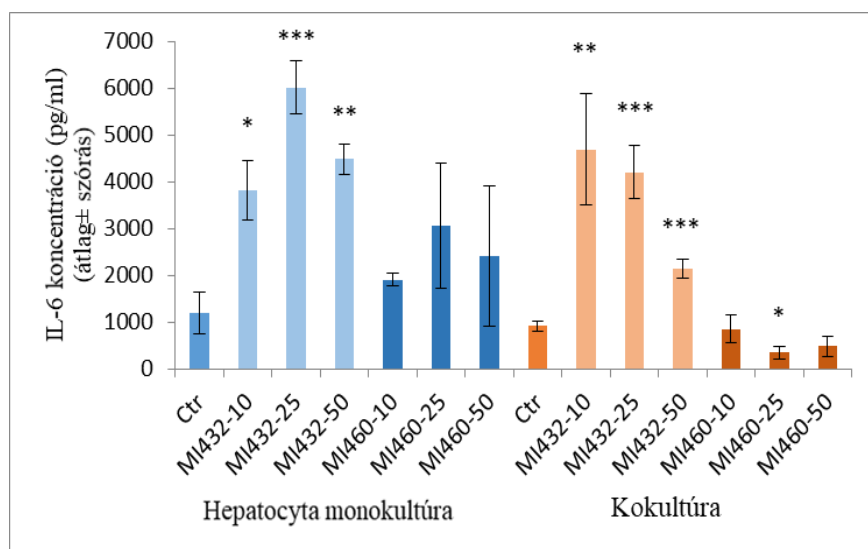
Az IL-6 termelésének rövid idejű vizsgálatakor a MI432 számú inhibitor minden koncentrációja esetében a kontroll csoporthoz képest számottevő növekedést figyeltünk meg monokultúrán. Kokultúrán is a MI432 vegyületnek a 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ -es koncentrációja okozott szignifikáns növekedést a citokin mennyiségében (7. ábra).

7. ábra Szendvics ELISA módszerrel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek rövid távú (4 órás) hatása a sejtek IL-6 termelésére. Az adatokat az összfehérje mennyiséggel korrigált IL-6 koncentráció átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$; * $p<0,05$, $p^{***}<0,001$.



A hosszabb idejű kezelést követően végzett mérés során hasonló eredményeket észleltünk. Jelen esetben monokultúrán szignifikáns növelő hatását tapasztaltuk a MI432 inhibitor koncentrációinak, kokultúrán ezen a vegyületen kívül a MI460 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjának jelentős citokin csökkentő hatását detektáltuk (8. ábra).

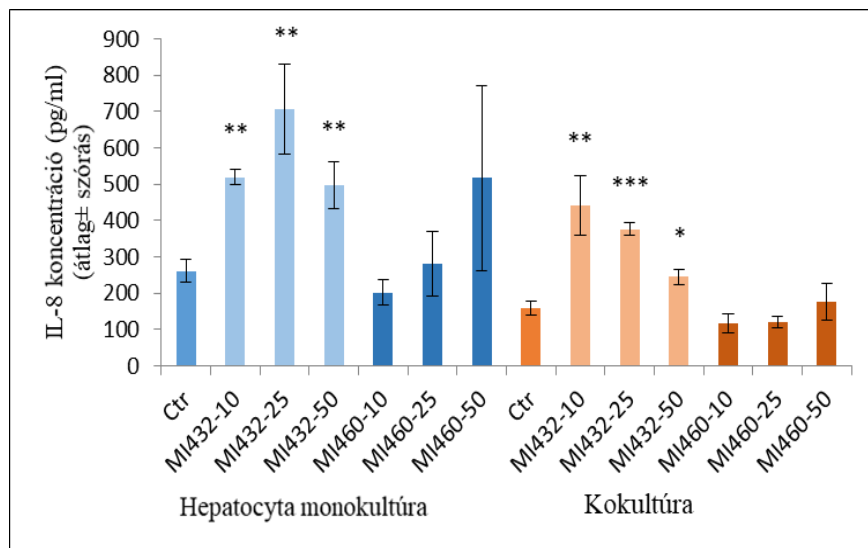
8. ábra ELISA-val vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek IL-6 termelésére 24 órás inhibitoros kezelést követően. Az adatokat az összfehérje mennyiséggel korrigált IL-6 koncentráció átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3$ /csoport; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.



4.4 Interleukin-8 termelés vizsgálata

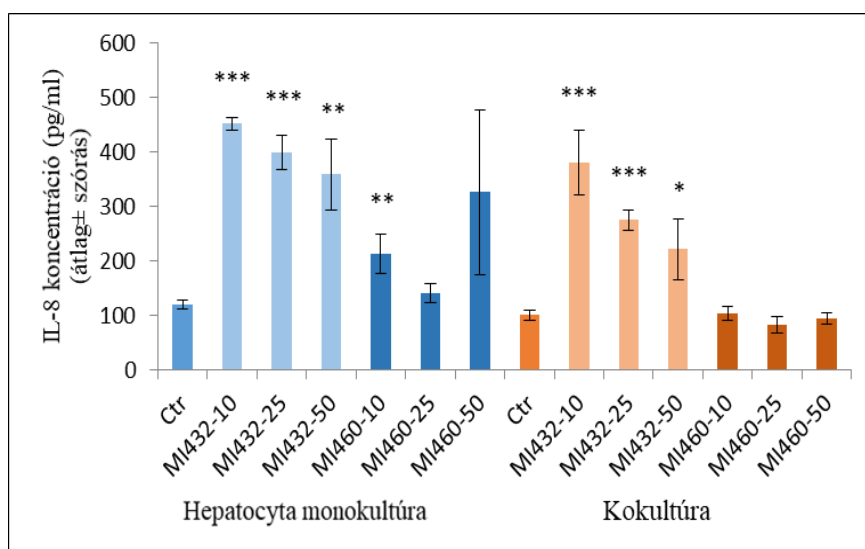
A másik gyulladásos citokin, az IL-8 koncentrációjának szendvics ELISA-val történő vizsgálata során, a rövidebb kezelési idő leteltével hepatocyt monokultúra és hepatocyt - Kupffer-sejt kokultúra esetében is a MI432 inhibitor koncentrációi okoztak szignifikáns növekedést (9. ábra).

9. ábra ELISA-val vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek IL-8 termelésére 4 órás inhibitoros kezelést követően. Az adatokat az összfehérje mennyiséggel korrigált IL-8 koncentráció átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, p*** $<0,001$.



A hosszabb idejű inkubálás leteltével történt IL-8 mennyiségének mérése során a MI432 sorszámú vegyület hatása bizonyult számottevőnek mind monokultúrán, mind kokultúrán. Ezen felül monokultúrán szignifikáns hatását mutattuk ki a MI460 számú inhibitor 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjának (**10. ábra**). A két sejtmódel eredményei között nincsen releváns eltérés.

10. ábra Szendvics ELISA módszerrel vizsgálva a MI432 és MI460 vegyületek hatása a sejtek IL-8 termelésére 24 órás inhibitoros kezelést követően. Az adatokat az összfehérje mennyiséggel korrigált IL-8 koncentráció átlag $\pm$ SEM ábrázoltuk; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3/\text{csoport}$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, $p^{***}<0,001$.



5. Megbeszélés

Kutatásunk során csirke májsejtmodelleken vizsgáltuk, hogy a 3-ApA matriptáz inhibitorok milyen hatást gyakorolnak a sejtek metabolikus aktivitására, IL-6 és -8 termelésére, valamint befolyásolják-e a sejtek oxidatív státuszát. Az általunk alkalmazott hepatocytá mono- és hepatocytá - nem-parenchymális sejt kokultúrák ideális modellek az egészséges és gyulladásos máj folyamatainak tanulmányozására (Mackei et al., 2020). Ezáltal megfelelően vizsgálhatók rajtuk a matriptáz gátlásának következményei madarakban.

A CCK-8 vizsgálat eredményei alapján elmondható, hogy mind a MI432, mind a MI460 inhibitor alkalmazását követően 4 óra elteltével csökkent a sejtek metabolikus aktivitása. Azonban a csökkenés mértéke alapján az inhibitorok nem bizonyultak citotoxikusnak. A 24 órás inkubációs időt követően történt mérés egyik gátló vegyület esetén sem mutatott a sejtmodellek metabolikus aktivitásában szignifikáns eltérést a kontrollokhoz képest. Ezáltal valószínűsíthető, hogy a májsejtek gyors metabolikus adaptáció révén hatékonyan alkalmazkodtak az inhibitor jelenlétéhez.

A sejtek oxidatív státuszát az inhibitorok jelenléte a legtöbb esetben nem befolyásolta jelentősen. A MI432 inhibitor 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációja a 4 órás kezelés esetén monokultúrán szignifikánsan növelte az extracelluláris ROS mennyiségét. Ezzel szemben a 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott MI460 inhibitor mindkét kezelési idő során kokultúrán antioxidáns hatásának bizonyult. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált 3-ApA vegyületeknek a legtöbb koncentrációban nincsen jelentős hatása a csirkéből származó májsejtek redox állapotára, néhány esetben viszont az oxidatív állapot modulátorai lehetnek. Eredményeinkhez hasonlóan sertés májmodell esetén sem tapasztalták az 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott MI432 és MI460 inhibitorok szignifikáns hatását az extracelluláris H_2O_2 termelésre 2 órás inkubációs időt követően. Viszont a hasonló felépítésű MI441 3-ApA vegyület ugyanilyen koncentrációja 2 óra elteltével oxidatív stresszt idézett elő a májsejtekben (Pomothy et al., 2016). Sertés máj eredetű sejtmodelleken 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazott MI441 inhibitor nem befolyásolta a sejtek oxidatív státuszát 24 órás kezelést követően (Pásztai-Gere et al., 2020). Extrahepatikus szövetek tekintetében IPEC-J2 bélhámsejtvonalon Pásztai-Gere és munkatársai (2015) vizsgálták a MI432 vegyület 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációját, amely átmeneti növekedést okozott az extracelluláris ROS termelésében a rövid, 2 óráig tartó kezelés során. Hosszabb idejű inkubálás után a H_2O_2 termelésének mértéke visszaállt a kiindulási szintre,

így az inhibitorral kezelt és a kezeletlen csoport H_2O_2 mennyiségében nem volt eltérés. Az eddigi eredmények alapján a matriptáz bizonyos esetekben befolyásolhatja a ROS termelődését, viszont csak kis mértékben, így a matriptáz nem tekinthető a sejtek fő redox homeosztázist szabályozó enzimének. A vizsgált matriptáz inhibitorok nem befolyásolják jelentős mértékben a tenyésztett májsejtek redox állapotát, ezáltal alkalmazásuk biztonságos anélkül, hogy oxidatív stresszt váltanának ki a sejtekben.

Az IL-6 és IL-8 mennyiségének vizsgálatakor a MI432 inhibitor hatására a felülúszóban 4 és 24 órás kezelést követően mono- és kokultúrán is a gyulladásos citokinek szignifikánsan emelkedett koncentrációit mértük, a vegyület pro-inflammatorikus hatással bírt. Ez alól kivétel kokultúrán MI432 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációja, mely az IL-6 mennyiségének 4 órás mérése során nem mutatott jelentős eltérést a kontroll csoporthoz képest. A MI460 vegyület a MI432-vel ellentétben sem az IL-6, sem az IL-8 citokinek koncentrációit nem befolyásolta jelentősen (kivétel a 24 órás kezelésnél a 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció monokultúrán). A kezelést követően 4 órával végzett mérés során az inhibitorok hatása a citokin mennyiségre monokultúrán kifejezettebb volt, mint kokultúrán. Ezzel szemben a hosszabb, 24 órás inkubációval végzett vizsgálatkor a két sejtmoddellen mért eredmények közötti eltérések mértéke kisebbnek bizonyult.

Bár a kísérletünkben használt mindkét vegyület hasonló szerkezetű 3-APhA matriptáz inhibitor, de eredményeink alapján jelentősen eltérő hatással bírnak a sejtek működésére. Az eltérő hatás oka lehet a különböző K_i érték, amellyel a májban található matriptáz gátlására képesek. A matriptáz MI432 inhibitorral történt gátlása az IL-6 és -8 gyulladásos citokinek termelődését jelentősen fokozta, így valószínűsíthető, hogy az élettanilag szabályozott matriptáznak fontos szerepe van a máj homeosztázisának fenntartásában csirkében, elkerülve a pro-inflammatorikus citokinek túlzott termelődését. A metabolikus aktivitással ellentétben a gyulladásos citokinek koncentrációja 24 órás inkubációt követően sem normalizálódott a MI432 alkalmazását követően, ezért feltehetőleg a vegyületekhez történt metabolikus adaptáció nem kapcsolódik a máj gyulladásos homeosztázisának helyreállításához.

Korábbi kutatások során a matriptáz szerepét a gyulladásos folyamatokban különböző emlős eredetű sejtenyészeteken vizsgálták, madár sejteken eddig nem történtek ilyen irányú vizsgálatok. Pomothy és munkatársai (2016) sertés májból készült gyulladásos sejtmoddellen tanulmányozták a MI432 és a MI460 gyulladásos folyamatokra gyakorolt

hatásait. 2 órás inkubációt követő mérés eredményeként a kokultúrákon nem találtak eltérést a citokinek koncentrációiban az inhibitorok hatására, tehát a vegyületek jelenléte nem befolyásolta a máj gyulladásra adott válaszát (Pomothy et al., 2016). Pászti-Gere és munkatársai (2020) 24 órás kezelést követően a sertés májból izolált hepatocytá mono- és hepatocytá - Kupffer-sejt kokultúrá a MI461, egy másik 3-ApA inhibitor vizsgálatakor nem mutatták ki IL-6 és -8 koncentrációját befolyásoló képességét (Pászti-Gere et al., 2020). Emberekben a matriptáz-1 aktivációját számos gyulladással járó bőrbetegséggel hozták összefüggésbe, az aktivációt a kor vagy a nap által okozott károsodások is befolyásolhatják (Chen et al., 2011). Gyulladásos vastagbél szöveteket vizsgálva a matriptáz-1 csökkent kifejeződését állapították meg, tehát vastagbélgyulladás során a matriptáz-1 a bélbarrier helyreállításával gyulladásgátló hatásának bizonyult (Netzel-Arnett et al., 2012). Az emlős sejteken végzett megelőző és a jelen, madár sejteken végzett kutatás eltérő eredményei alapján elmondható, hogy a matriptáz működése fajfüggő, illetve rámutat a matriptázaktivitás és a gyulladás közötti összetett kapcsolatra.

A mono- és kokultúrák kapott eredmények összevetése esetén nem figyelhető meg jelentős eltérés a két sejtmodell között, ez megegyezik a Pászti-Gere és munkatársai (2020) által korábban sertés májsejtmodellel végzett kutatás eredményével. Ez arra utalhat, hogy a máj nem-parenchymális sejtjeinek jelenléte nem befolyásolja jelentős mértékben a matriptáz gátlásának hatását. A 6:1 arányban alkalmazott hepatocytá - Kupffer-sejt kokultúra a gyulladásban levő máj modelljeként szolgált, így valószínűsíthető, hogy ezek a 3-ApA származék inhibitorok hasonló hatásokat váltanak ki fiziológiás körülmények között és enyhén gyulladt májban egyaránt. A MI432 mindkét sejtmodell esetén megfigyelhető pro-inflammatorikus hatása alapján valószínűleg a matriptáz a csirke máj gyulladásának egyik fontos szabályozó enzime, ami megakadályozza a gyulladásos citokinek túlzott mértékű felszabadulását. A matriptáz korábban említett hatásai mögött álló mechanizmusok megismerésére további célzott kutatások szükségesek, viszont jelen kutatás az első, amely rávilágított a matriptáz szerepére a madár máj homeosztázisának fenntartásában. Mivel a későbbiekben a matriptáz inhibitorok gyógyszerként való alkalmazása a cél, így fontos a matriptáz madarakban újonnan felfedezett hatásaival tovább foglalkozni, hogy pontos képet kapjunk a szabályozás mechanizmusáról.

6. Összefoglalás

A membránhoz kapcsolt transzmembrán szerin-proteáz családba tartozó matriptáz enzimnek számos jelentős élettani hatása ismert a gyulladásos válasz kialakításában, vasanyagcsere szabályozásában és az epitheliális barrier integritásának szabályozásában, emiatt gátlása számos betegség esetén gyógyszerfejlesztési célpont lehet. Mivel a korábbi kutatások főként emlős sejtekre fókuszáltak, így a matriptáz szerepei madár sejteken még nem teljesen tisztázottak. Jelen kutatásban MI432 és MI460 sorszámú 3-ApA származék inhibitorok hatásait vizsgáltuk a sejtek gyulladásos és oxidatív állapotára csirkemáj eredetű hepatocita mono- és hepatocita - nem-parenchymális sejt kokultúrán. A sejtenyészetek a madár májmodelljeként szolgáltak.

A sejtmódelleket 4 és 24 óra időtartamban kezeltük a MI432 és MI460 vegyületek 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációival és vizsgáltuk a sejtek metabolikus aktivitását, IL-6, IL-8, illetve H_2O_2 termelését az inhibitoros kezelés hatására.

Mindkét inhibitor a 4 órás kezelést követően csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását, ami 24 óra elteltével normalizálódott a sejtek inhibitorokhoz történt metabolikus adaptációja következtében. A MI432 vegyület minden koncentrációja, mindkét inkubációs idő elteltével fokozta az IL-6 és -8 pro-inflammatorikus citokinek termelődését, viszont ezzel összefüggésben nem okozott a sejtekben oxidatív stresszt, a ROS változatlan mértékű termelődése alapján. A MI460 inhibitor a legtöbb esetben nem befolyásolta a sejtmódellek IL-6 és -8 gyulladásos citokinek, illetve a H_2O_2 termelődését.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a fiziológiás matriptáz aktivitásnak jelentős szerepe van csirke máj gyulladásos és metabolikus homeosztázisának szabályozásában és az élettani értékek fenntartásában, anélkül, hogy a máj oxidatív állapotának fő modulátora lenne. A matriptázgátló vegyületek későbbiekben esetlegesen gyógyszerként való alkalmazása esetén, fontos figyelembe venni az enzim újonnan felfedezett tulajdonságait.

7. Summary

The effects of matriptase inhibition on the inflammatory and redox homeostasis of chicken hepatic cell culture models

The membrane-anchored transmembrane serine protease enzyme matriptase has important role in inflammatory response, iron homeostasis and epithelial barrier integrity regulation. Thus, inhibited matriptase can be a potential novel target to treat several diseases. Previous studies focused on investigating matriptase functions in mammals, while its role in birds remained unclear. The aim of the present study was to investigate the effects of the 3-APhA matriptase inhibitors MI432 and MI460 on the inflammatory and oxidative state of chicken hepatocyte mono- and hepatocyte – non-parenchymal cocultures. The applied cellcultures served as a proper model of the avian liver.

The cellcultures were treated with MI432 and MI460 at 10, 25 and 50 $\mu\text{mol/l}$ concentrations for 4 h and 24 h incubation times, after that the cellular metabolic activity, extracellular IL-6, IL-8, and H_2O_2 levels were monitored.

Both inhibitors caused a transient moderate reduction in the cellular metabolic activity after the 4 h incubation time, which was restored after 24 h due to the fast hepatic adaptation potential to MI administration. After both incubation times in all concentrations MI432 triggered an intense elevation in the cellular pro-inflammatory IL-6 and IL-8 production, which was not coupled to enhanced oxidative stress on unchanged H_2O_2 production levels. MI460 in most concentrations and after both incubation times did not influence the cellular IL-6, -8, and H_2O_2 production.

Our results suggest that physiological matriptase activities might have key function in retaining the metabolic and inflammatory homeostasis of the chicken liver, without being a major modulator of the hepatocellular redox state. If matriptase inhibitors were considered to be administered as drug candidates in the future in veterinary medicine, the newly suggested function of matriptase in chicken should be carefully addressed.

8. Irodalomjegyzék

Barna R.F., Mackei M., Pászti-Gere E., Neogrády Zs., Jerzsele Á., Mátis G., 2021: The effects of matriptase inhibition on the inflammatory and redox homeostasis of chicken hepatic cell culture models, *Biomedicines*, 9. 450.

Baron J., Tarnow C., Mayoli-Nüssle D., Schilling E., Meyer D., Hammami M., Schwalm F., Steinmetzer T., Guan Y. Garten W., Klenk HD., Böttcher-Friebertshäuser E., 2013: Matriptase, HAT, and TMPRSS2 Activate the Hemagglutinin of H9N2 Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, 87/3. 1811-1820.

Beaulieu A., Gravel É., Cloutier A., Marois I., Colombo É., Désilets A., Verreault C., Leduc R., Marsault É., Richter M.V. 2013: Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium, *Journal of Virology*. 87. 4237-4251.

Bugge T.H., Antalis T.M., Wu Q., 2009: Type II Transmembrane Serine Proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284/35. 23177-23181.

Chen C.J., Wu B.Y., Tsao P.I., Chen C.Y., Wu M.H., Chan Y.L., Lee H.S., Johnson M.D., Eckert R.L., Chen Y.W., Chou F., Wang J.K., Lin C.Y., 2011: Increased matriptase zymogen activation in inflammatory skin disorders. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300. 406-415.

Du X., She E., Gelbart T., Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K., Mudd S, Mann N, Moresco E. M. Y., Beutler E, Beutler B., 2008: The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, 320/5879. 1088-1092.

Finberg K.E. Heeney M.M., Campagna D.R., Aydinok Y., Pearson H.A., Hartman K.R., Mayo M.M., Samuel S.M., Strouse J.J., Markianos K., Andrews N.C., Fleming M.D., 2008: Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nature Genetics*, 40. 569–571.

Folgueras A.R., de Lara F.M., Pendás A.M., Garabaya C., Rodríguez F., Astudillo A., Bernal T., Cabanillas R., López-Otín C., Velasco G., 2008: Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood*, 112/6. 2539-2545

Förbs D., Thiel S., Stella M.C., Stürzebecher A., Schweinitz A., Steinmetzer T., Stürzebecher J., Uhland K., 2005: In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma. *International Journal of Oncology*, 2. 1061-1070

Hammami M., 2012: Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase. PhD értekezés. Marburg. Philipps-Universität Marburg. p. 44, 47. URL: <https://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2012/0955/pdf/dmh.pdf> Megtekintve: 2021.02.12.

Hammami M., Rühmann E., Maurer E., Heine A., Gutschow M., Klebe G., Steinmetzer T., 2012: New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase. *Medicinal Chemistry Communication*, 2012/3. 803. 807-813.

- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N-H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S., 2020: SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181. 271-280.
- Hooper, J.D., Campagnolo, L., Goodarzi, G., Truong, T.N., Stuhlmann, H., Quigley, J.P., 2003: Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues. *Biochemical Journal*, 373, 689-702.
- Mackei M., Molnár A., Nagy S.; Pál L., Kővágó C., Gálfi P., Dublec K., Husvéth F., Neogrády Z., Mátiš, G., 2020 Effects of Acute heat stress on a newly established chicken hepatocyte-nonparenchymal cell co-culture model. *Animals*, 10. 409.
- Mátiš G., Kulcsár A., Petrilla J., Talapka P., Neogrády Z., 2017: Porcine hepatocyte-Kupffer cell co-culture as an in vitro model for testing the efficacy of anti-inflammatory substances. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 101/2. 201-207.
- Meyer D., Sielaff F., Hammami M., Böttcher-Friebertshauser E., Garten W., Steinmetzer T., 2013: Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochemical Journal*, 452/2. 331-343.
- Milner J.M., Patel A., Davidson R.K., Swingle T.E., Desilets A., Young D.A., Kelso E.B., Donell S.T., Cawston T.E., Clark I.M., Ferrell W.R., Plevin R., Lockhart J.C., Leduc R., Rowan A.D., 2010: Matriptase is a novel initiator of cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 62/7. 1955-1966.
- Murray A.S., Varela F.A., List K., 2016: Type II transmembrane serine proteases as potential targets for cancer therapy. *Journal of Biological Chemistry*, 397(9). 815-826.
- Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., McVey Ward D., Ganz T., Kaplan J., 2004: Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306/5704. 2090-2093.
- Netzel-Arnett S., Buzza M.S., Shea-Donohue T., Désilets A., Leduc R., Fasano A., Bugge T.H., Antalis T.M., 2012: Matriptase protects against experimental colitis and promotes intestinal barrier recovery. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18. 1303-1314.
- Parr C., Sanders A.J., Davies G., Martin T, Lane J., Mason M.D., Mansel R.E., Jiang W.G., 2007: Matriptase-2 Inhibits Breast Tumor Growth and Invasion and Correlates with Favorable Prognosis for Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 13. 3568-3576.
- Pászti-Gere E., Barna R.F., Ujhelyi G., Steinmetzer T., 2016: Interaction exists between matriptase inhibitors and intestinal epithelial cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 31/5. 736-741.
- Pászti-Gere E., McManus, S., Meggyesházi N., Balla P., Gálfi P., Steinmetzer, T., 2015: Inhibition of matriptase activity results in decreased intestinal epithelial monolayer integrity in vitro. *PLoS ONE*, 10. e0141077.

- Pászt-Gere E., Szombath G., Gütschow M., Steinmetzer T., Székács A., 2020: 3-Amidinophenylalanine-derived matriptase inhibitors can modulate hepcidin production in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393. 511-520.
- Pinnix Z.K., Miller L.D., Wang W., D'Agostino R. Jr., Kute T., Willingham M.C., Hatcher H., Tesfay L., Sui G., Di X., Torti S.V., Torti F.M., 2010: Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Science Translational. Medicine*, 2/43. 43ra56
- Pomothy J., Szombath G., Rokónál P., Máti G., Neogrády Z., Steinmetzer T., Pászt-Gere E., 2016: The Impact of Acute Matriptase Inhibition in Hepatic Inflammatory Models. *BioMed Research International*, 2016, 1-8
- Rohlich P., 2006: Szöveetan. Az emésztőrendszer nagy mirigyei. Budapest, Semmelweis Kiadó. 315-325.
- Sanders A.J., Parr C., Martin T.A., Lane J., Mason M.D., Jiang W.G., 2008: Genetic upregulation of matriptase-2 reduces the aggressiveness of prostate cancer cells in vitro and in vivo and affects FAK and paxillin localisation. *Journal of Cellular Physiology*, 216/3. p. 780-789.
- Silvestri L., Pagani¹ A., Nai A., De Domenico I., Kaplan J., Camaschella C., 2008: The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metabolism*, 8/6. p. 502-511.
- Szabo R., Bugge T. H., 2008: Type II transmembrane serine proteases in development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40/6-7. p. 1297-1316.
- Uhland, K., Siphos, B., Arkona, C., Schuster, M., Petri, B., Steinmetzer, P., Mueller, F., Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Van De Locht, A., 2009: Use of IHC and newly designed matriptase inhibitors to elucidate the role of matriptase in pancreatic ductal adenocarcinoma, *International. Journal of Oncology*, 35. p. 347-357.
- Velasco G., Cal S., Quesada V., Sánchez L.M., López-Otín C., 2002: Matriptase-2, a Membrane-bound Mosaic Serine Proteinase Predominantly Expressed in Human Liver and Showing Degrading Activity against Extracellular Matrix Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277/40. p. 37637-37646.

9. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Barna Réka Fanninak és Dr. Mátis Gábornak, amiért részt vehettem a kutatási munkában. Szeretném megköszönni elengedhetetlen közreműködésüket a dolgozat létrejöttéhez, valamint folyamatos tanácsaikat, útmutatásaikat és támogatásukat.

Köszönetemet szeretném kifejezni Vörösházi Júliának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségéért.

Külön köszönet Prof. Dr. Torsten Steinmetzer Professzor Úrnak (Philipps University Marburg, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Marburg, Németország) a szelektív matriptáz inhibitorok szintetizálásáért.

Illetve szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a türelmüket és támogatásukat, amivel elősegítették a dolgozat létrejöttét.

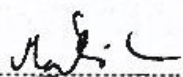
Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott DR. MÁTIS GÁBOR..... Igazolom, hogy

HAMOR FANNI ZSÓFIA..... (a hallgató neve)

HATRIPTÁZ INHIBITOROK HATÁSAINAK VIZSGÁLATA CSIRKE EREDETŰ
MA'JSEJTMODELLEKEN
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2021. 04. 30.

DR. MÁTIS GÁBOR 

a témavezető neve és aláírása

ÁTE ÉLETTANI ÉS BIOKÉMIAI

TANSZÉK BIOKÉMIAI OSZTÁLY

tanszék