

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2839.

BALÁZS-NÉMETH KRISZTINA

A humán molekuláris genetika és a géndiagnosztika alapjai
című program

Programvezető: Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Tamási Viola, egyetemi docens

Hiperlipidémia hatása a máj lipidfelhalmozására, az extracelluláris vezikula szekréciójára és felvételére

Doktori értekezés

Balázs-Németh Krisztina

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tamási Viola, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Monostory Katalin, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Prohászka Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Németh Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Lőrincz M. Ákos, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
I. Bevezetés.....	8
1. Extracelluláris vezikulák.....	8
2. Extracelluláris vezikulák vizsgálata.....	10
3. Az extracelluláris vezikulák disztribúciója.....	12
4. A máj felépítése és funkciói.....	15
5. Lipidanyagcsere	17
5.1 Lipoproteinek	17
5.2 PCSK9 szerepe a szervezet lipidanyagcseréjében	19
5.3 Lipoproteinek és az EV-k kapcsolata az izolálás szempontjából.....	20
5.4 Hiperlipidémia.....	22
5.5 Hiperlipidémia hatása a máj EV termelésére	23
II. Célkitűzés.....	25
III. Módszerek	26
1. Állatkísérletek	26
2. A máj génexpressziójának vizsgálata kvantitatív PCR-rel	27
3. A máj PCSK9 fehérje tartalmának meghatározása.....	27
4. A máj CD36, LDLR és ANXA2 fehérje tartalmának meghatározása	28
5. A máj lipidomikai vizsgálata HPLC-MS/MS segítségével	29
6. Plazma eredetű EV-k szeparálása	30
7. <i>In vitro</i> kísérletekben használt sejt kultúrák modellek	31
7.1 Primer májsejtek izolálása.....	32
7.2 Hepatocita monokultúra	32
7.3 Hepatocita-NPC ko-kultúra.....	33
8. Immunitokémia	33

9. Kezelés szabad zsírsavakkal	34
10. Olajvörös festés.....	34
11. Albumin és húgysav termelés vizsgálata	35
12. Májsejtek citokin termelésének vizsgálata	35
13. Hepatocita eredetű EV-k szeparálása	35
14. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k szeparálása.....	36
15. Az EV minták karakterizálása MISEV2018 irányelvei alapján	37
15.1 Az EV minták vizsgálata TEM-mel	37
15.2 Az EV-k nanopartikulum követési vizsgálata.....	38
15.3 Az EV-k fehérje és lipid tartalmának meghatározása	38
15.4 Az EV-k áramlási citométerrel történő vizsgálata	39
15.5 EV fluoreszcenciájának detektálása FOBI készülék segítségével	40
16. Az EV felvétel vizsgálata áramlási citometriával.....	41
17. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k radioizotópos jelölése és <i>in vivo</i> SPECT/CT követése	42
18. Statisztikai analízis és használt grafikai szoftverek	43
IV. Eredmények.....	44
1. HFD vagy kontroll tápon tartott egerek karakterizálása	44
2. A máj lipid akkumulációjának vizsgálata	45
3. A máj PCSK9, LDLR, ANXA2 és CD36 expressziójának vizsgálata	47
4. A hiperlipidémia hatása az egér vérplazma EV tartalmára.....	49
5. A plazma sEV és az egerek testtömege, plazma koleszterin és a máj lipid tartalma közötti korreláció vizsgálata	50
6. FFA kezelés hatása a májsejt kultúrákra.....	51
7. A májsejtek citokin termelésének vizsgálata	53
8. A hiperlipidémia hatása a hepatociták EV termelésére	54

9. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k <i>in vivo</i> eloszlása.....	55
10. EV felvétel hepatocita monokultúrában normo- és hiperlipémiás környezetben .	58
11. EV felvétel hepatocita-NPC ko-kultúrában normo- és hiperlipémiás környezetben	59
V. Megbeszélés.....	60
VI. Következtetések.....	66
VII. Összefoglalás	68
VIII. Summary.....	69
IX. Irodalomjegyzék.....	70
X. Saját publikációk jegyzéke	87
XI. Köszönetnyilvánítás	89
XII. Függelékek.....	90
1. A 20. ábráról hiányzó, további western blot képek	90
2. Vágatlan western blot képek.....	90
3. Grafikus absztrakt	91

Rövidítések jegyzéke

5-HT	5-hidroxi-triptamin (5-hydroxytryptamine)
^{99m} Tc	technécium-99m (technetium-99m)
ALIX	ALG-2-vel kölcsönhatásba lépő fehérje 1 (ALG-2-interacting protein 1)
APO	apoptótikus test (apoptotic body)
ApoB	apolipoprotein B
ApoC	apolipoprotein C
ApoE	apolipoprotein E
ApoER2	apolipoprotein E receptor 2
CCL17/22	C-C motívum kemokin ligand 17/22 (C-C motif chemokine ligand 17/22)
CD	differentiációs klaszter (cluster of differentiation)
CER	ceramid (ceramide)
CT	komputertomográfia (computed tomography)
CXCL1	C-X-C motívum kemokin ligand 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1)
DG	diglicerid (diglyceride)
EGFA	epidermális növekedési faktor-szerű ismétlődés A (epidermal growth factor-like repeat A)
END	megnyúlt neutrofil eredetű struktúra (elongated neutrophil-derived structures)
ESCRT	szállításához szükséges endoszómális válogató komplex (endosomal sorting complexes required for transport)
EV	extracelluláris vezikula (extracellular vesicle)
EXO	exoszóma (exosome)
FBS	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)

FFA	szabad zsírsav (free fatty acid)
FOBI	fluoreszcencia alapú teljes test képalkotás (fluorescence-labeled organism bioimaging instrument)
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
G-CSF	granulocita kolónia stimuláló faktor (granulocyte colony-stimulating factor)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GPI	glikozil-foszfatidil-inozitol (glycosyl-phosphatidylinositol)
HDL	magas sűrűségű lipoprotein (high-density lipoprotein)
HFD	magas zsírtartalmú diéta (high fat diet)
HMPAO	hidrazinonikotinil (hydrazinonicotinyI)
IDL	átmeneti sűrűségű lipoprotein (intermediate-density lipoprotein)
IL	interleukin
ISEV	Nemzetközi Extracelluláris Vezikula Társaság (International Society for Extracellular Vesicles)
KC	Kupffer sejt (Kupffer cell)
LDL	alacsony sűrűségű lipoprotein (low-density lipoprotein)
LDLR	alacsony sűrűségű lipoprotein receptor (low-density lipoprotein receptor)
LEV	nagy extracelluláris vezikula (large extracellular vesicle)
Lp(a)	lipoprotein(a)
LPS	lipopoliszacharid (lipopolysaccharide)
LRP1	LDL receptor kapcsolt fehérje 1 (LDL receptor related protein 1)
LSEC	máj szinuszoidális endotél sejt (liver sinusoidal endothelial cell)

mEV	közepes extracelluláris vezikula (medium extracellular vesicle)
MHCII	fő hisztokompatibilitási komplex II (major histocompatibility complex II)
MISEV2018	Alapvető tudnivalók az extracelluláris vezikulák vizsgálatához 2018 (Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018)
MV	mikrovezikula (microvesicle)
MVB	multivezikuláris test (multivesicular body)
NAFLD	nem-alkoholos zsírmáj (non-alcoholic fatty liver disease)
NPC	nem parenchimális sejt (non-parenchymal cell)
NTA	nanopartikulum követő analízis (nanoparticle tracking analysis)
OA	olajsav (oleic acid)
PA	palmitinsav (palmitic acid)
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCSK9	proprotein-konvertáz szubtilizin/kexin 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)
PE	foszfatidil-etanolamin (phosphatidylethanolamine)
PET	pozitronemissziós tomográfia (positron emission tomography)
PFA	paraformaldehid (paraformaldehyde)
PS	foszfatidil-szerin (phosphatidylserine)
RAB7	Ras-rokon fehérje Rab-7a (Ras-related protein Rab-7a)
SEC	méretkizárásos kromatográfia (size exclusion chromatography)
sEV	kis extracelluláris vezikula (small extracellular vesicle)

SPECT	egyfoton-emissziós tomográfiáva (single-photon emission computed tomography)
SREBP2	szterol szabályozóelem-kötő fehérje 2 (sterol regulatory element-binding protein 2)
TEM	transzmissziós elektron mikroszkóp (transmission electron microscopy)
TG	triglicerid (triglyceride)
TGF- β 1	transzformáló növekedési faktor-béta 1 (transforming growth factor-beta 1)
TMP	T sejt eredetű mikrovillus partikulumok (T cell microvilli-derived particles)
TNF α	tumor nekrosis faktor-alfa (tumour necrosis factor alpha)
TSG101	tumor érzékenységi fehérje 101 (tumor susceptibility 101)
VLDL	nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (very low-density lipoprotein)
VLDLR	nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein receptor (very low-density lipoprotein receptor)

I. Bevezetés

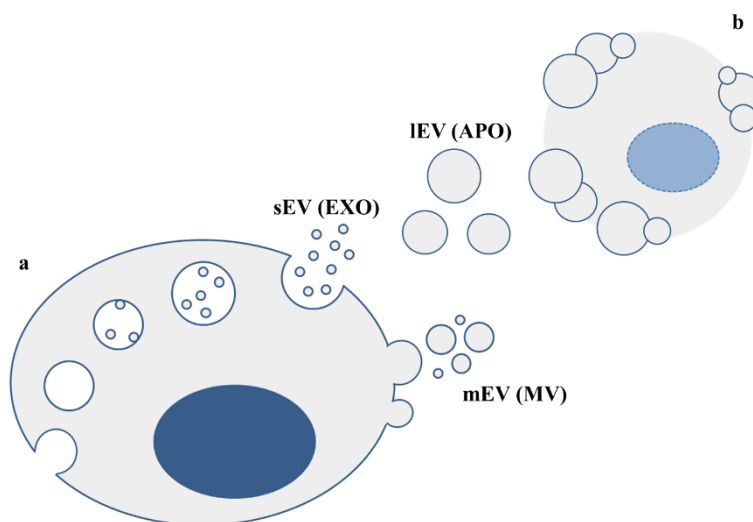
1. Extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák (EV) kettős foszfolipid réteggel határolt, döntően gömb alakú partikulumok [1]. Az EV-k szintézise prokariótáknál és az eukariótáknál egyaránt megfigyelhető, evolúciósan konzervált folyamat. Komplex molekuláris összetételük, a membránjuk és a lumenükben hordozott „rakományuk” (fehérjék, nukleinsavak, lipidek és szénhidrátok) révén fontos szerepük van a sejt-sejt közötti kommunikációban. A donor sejt típusa, állapota befolyásolhatja az EV-k összetételét [1]. 1946-ban figyeltek fel először rájuk, és úgy hitték, hogy ezen partikulumok vérlemezke eredetű szubcelluláris részecskék [2]. Ezt követően, 1983-ban két kutatócsoport egymástól függetlenül megfigyelte a retikulocitákból származó transzferrin receptort hordozó vezikulák jelenlétét az extracelluláris térben. Harding és Stahl multivezikuláris test (MVB) eredetű vezikulák (később exoszómák, EXO) szekréciójával, míg Pan és Johnstone a plazmamembrán lefűződésével kialakuló membrán partikulumokkal (később mikrovezikula, MV) magyarázta a jelenséget [3,4]. 1996-ban, több mint egy évtizeddel később, Raposo és kollégái bizonyították a B limfoblaszt eredetű, MHCII faktort hordozó EV-k antigén specifikus T sejt aktiváló képességét [5]. Ez a közlemény fordulatot hozott az EV kutatásban. Megjelenésétől kezdve exponenciálisan nőtt az EV-kkel foglalkozó publikációk száma. Egyre több funkciójukra derült fény fiziológiás és patológias folyamatokban egyaránt [6].

Klasszifikációjuk terén nincsen egyértelműen használt, konvencionális besorolás, terminológiájukat heterogenitás jellemzi az irodalomban [7]. Csoportosításuk klasszikusan a biogenezisük, intracelluláris eredetük alapján történik: eszerint elkülöníthetjük a sejt felszínéről lefűződő ektoszómákat (apoptotikus testek (APO), MV-k) és az endoszómális eredetű EXO-kat [1,8]. Az EXO-k intraluminális vezikulaként képződnek MVB-kben, amfiszómákban és azok plazmamembránnal történő fúziójával jutnak az extracelluláris térbe. Méretük az intraluminális vezikulákkal megegyezően a 100 nm alatti tartományba esik [9]. Az MV-k a plazmamembránról történő bimbózással keletkeznek. Kevésbé mutatnak korlátozott méreteloszlást (150 nm–1 μ m) [10]. A legnagyobb méretű (>1 μ m) APO-k szintén a plazmamembrán lefűződésével jönnek létre

apoptózis során. A biogenezis alapján történő szeparálás a jelenleg rendelkezésre álló módszerekkel nem lehetséges [7].

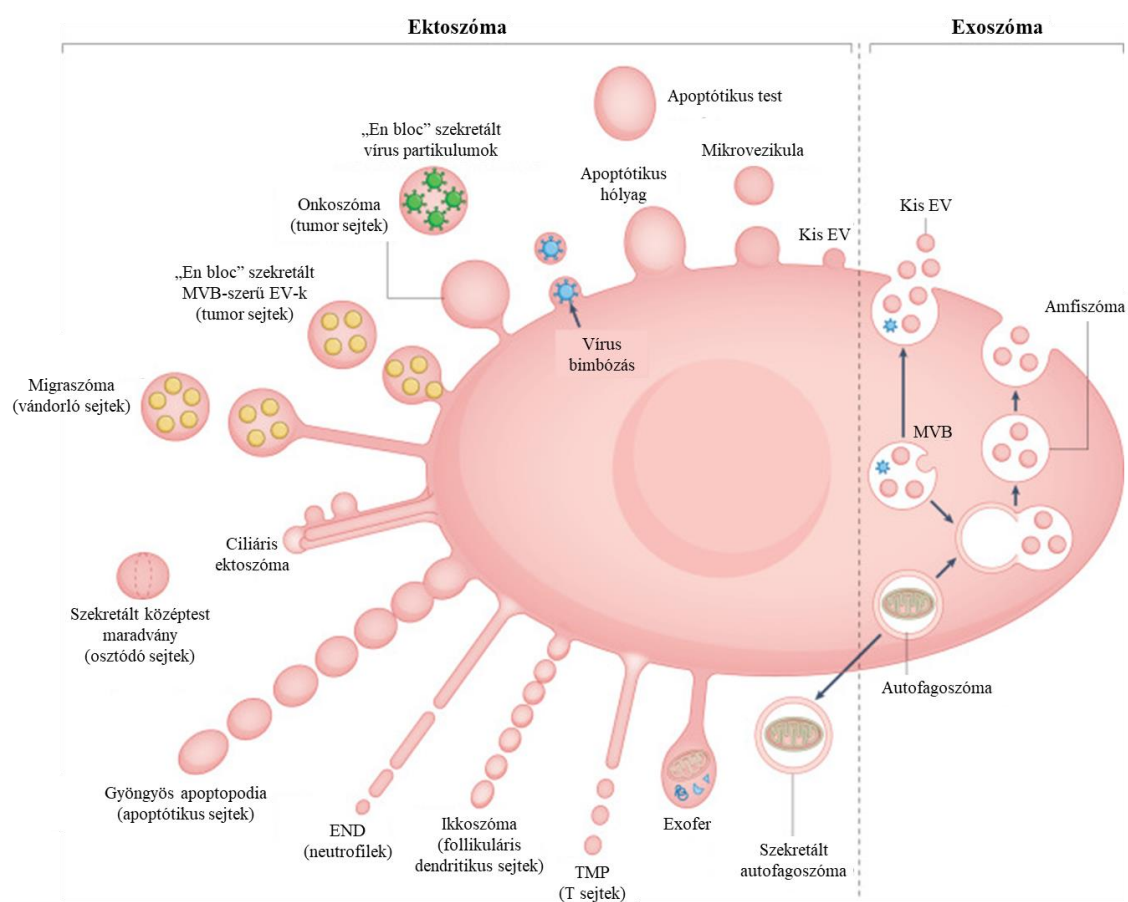
Az EV-k nevezéktana sem tekinthető egységesnek. A MISEV2018 (Alapvető tudnivalók az extracelluláris vezikulák vizsgálatához 2018) javasol egy nomenklatúrát, amely az EV-k képződését nem veszi figyelembe, a méreteloszláson alapszik, azonban a jelenleg alkalmazott szeparálási módszerekkel elkülöníthető populációkat egyértelműen behatárolja. Ez alapján elkülöníthetünk nagy (lEV – large EV), közepes (mEV – medium EV) és kis EV-eket (sEV – small EV). A képződés és a méreteloszlás alapján definiált alcsoportok átfednek: az APO-k döntően lEV-k, az MV-k mEV-k és az EXO-k sEV-k (**1. ábra**).



1. ábra: Az extracelluláris vezikulák klasszikus csoportosítása. Az EV-eket méretük alapján három csoportra oszthatjuk: nagy EV-k (lEV, $>1\ \mu\text{m}$), közepes EV-k (mEV, $150\ \text{nm} - 1\ \mu\text{m}$) és kis EV-k (sEV, $<100\ \text{nm}$). Az első két alpopuláció a plazmamembránról történő lefűződéssel, míg a kis EV-k az endocitotikus útvonalon keletkeznek. a) egészséges sejt, b) apoptotikus sejt (Bence György és mtsai., 2011 munkája alapján készített ábra [1])

Az elmúlt években számos EV alcsoportot azonosítottak a biofizikai, biokémiai tulajdonságok és a funkcionalitás alapján. [8] (**2. ábra**). Csoportos EV szekréció jellemzi a tumor és a vándorló sejteket egyaránt (migraszóma). Ezen kívül az lEV-khez sorolhatjuk a tumor sejtek által kibocsátott onkoszómákat, a szekretált autofagoszómákat, a sejtosztódás során távozó középtest maradványokat, az elhalt sejtorganelleumok és fehérje aggregátumok eltávolítására szolgáló exofereket. Különböző sejtek nyúlványairól történő lefűződéssel vagy annak feldarabolódásával is létrejöhetnek EV-k, például: ciliáris ektoszómák, gyöngyös apoptopódiák, meggyúlt neutrofil eredetű struktúrák

(END), follikuláris dendritikus sejt eredetű ikkoszómák és T sejt eredetű mikrovillus partikulumok (TMP) [8] (**2. ábra**). Az EV-khez hasonlóan a vírus partikulumok önállóan a plazmamembránról lefűződve, endoszómális úton exocitózissal vagy csoportosan („en-bloc”) membrán határolt módon távozhatnak a sejtől. A felsorolt példák is mutatják, hogy a klasszikus EV csoportoknál bemutatott lEV-k (**1. ábra**) nem csupán apoptotikus sejtekből származhatnak, élő sejtek is képesek szekréciójukra.



2. ábra: Az extracelluláris vezikulák heterogenitása.

(Az ábra forrása: EI. Buzás, *The roles of extracellular vesicles in the immune system*, Nat Rev Immunol, 2022, [8])

2. Extracelluláris vezikulák vizsgálata

Az EV-kkel történő munka során számos módszertani nehézségbe ütközhetünk: kis méretük és az alacsony EV/egyéb részecske arány miatt nagy kihívást jelent megfelelő tisztaságú EV-ket szeparálni és karakterizálni. Ennek okán a nemzetközi EV társaság

(International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) az EV alapú vizsgálatok áttekinthetősége, megfelelő interpretálása érdekében rendszeren frissített irányelveket ajánl. Vizsgálataink során az aktuális, MISEV2018 követelményrendszerét követtük [7].

- Az EV szeparálás:

Az EV szeparálás módszerének megválasztását a kísérleti kérdéseink, célunk határozza meg. A különböző eljárások eltérő tisztaságú és hozamú EV mintát eredményeznek. A tisztaság fokozása érdekében ajánlott a szeparálási módszereket kombinálni. Például a korábban aranystandardnak tartott differenciál ultracentrifugálással koncentrált EV-ket méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztíthatjuk. A leggyakrabban használt EV szeparálási módszereket a **1. táblázat** foglalja össze [11,12], az általunk használt technikák vastagabb szegéllyel kiemelve láthatók.

1. táblázat: A leggyakrabban használt EV szeparálási módszerek jellemzői.

Módszer	Alapelv	Előnyei	Hátrányai
differenciál ultracentrifugálás (aranystandard)	EV-k szekvenciális szétválasztása egyéb partikulumoktól ülepedési sebesség és a sűrűség alapján	magas EV hozam, közepes és nagy mintatérfogat	alacsony tisztaság, időigényes, magas eszköz költség, korlátozott párhuzamos mintafeldolgozás, EV károsodás
sűrűséggradiens ultracentrifugálás		magas tisztaság	alacsony EV hozam, idő- és munkaigényes, alacsony áteresztőképesség
tangenciális áramlású szűrés, TFF-Easy	Az EV-k szeparálása méret szerint, tangenciális áramú szűrőrendszerrel.	nagy mintatérfogat, magas EV hozam, gyors, EV-k membránhoz tapadása kevésbé valószínű	drága alacsony áteresztőképességű
precipitációs módszerek	Az EV-k felszíni töltését kihasználva vagy víz kivonó polimerekkel történik a szeparáció.	magas EV hozam, gyors, olcsó és egyszerű, párhuzamos mintafeldolgozás, kicsi, közepes és nagy mintatérfogat	specifitása alacsony, alacsony tisztaság, egyéb partikulumok ko-precipitációja nagymértékű, precipitációs reagens eltávolítása szükséges
méretkizárásos kromatográfia	Az EV-k szeparálása méret, alak és molekulatömeg alapján történik.	közepes, magas tisztaság, alacsony nyírófeszültség	kicsi mintatérfogat, mintafüggő frakciók
ultrafiltráció		gyors, olcsó és egyszerű, párhuzamos mintafeldolgozás, kicsi, közepes és nagy mintatérfogat	EV hozam csökkenése az EV-k membránhoz tapadása miatt, magas nyírófeszültség
affinitás alapú szeparálási módszerek	A szeparálás az EV asszociált markerek és specifikus antitestek közötti kapcsolódáson alapul.	magas tisztaság, EV altípusok szeparálása, párhuzamos mintafeldolgozás	csak bizonyos alpopulációkra korlátozott, EV elúció nem hatékony, kis mintatérfogat

- Az EV frakciók kvantifikálása

Az EV-k mennyiségét normalizálhatjuk a kiindulási folyadék, sejtszám és a szövet tömege alapján. Emellett minimum két független módszerrel kell jellemeznünk az EV mintákat: pl. koncentráció vagy abszolút EV szám a mintában, fehérje, lipid, nukleinsav vagy egyéb biomolekula tartalom alapján. A mennyiségi jelzőszámokat kombinálva, azok arányai (pl. fehérje/EV szám, fehérje/lipid) tisztasági mutatóként használhatók.

- Az EV frakciók karakterizálása

Az EV-k jelenlétét igazolnunk kell EV asszociált markerek kimutatásával. A következő három kategóriából minimum egy-egy fehérje jelenlétét bizonyítanunk kell: 1) plazmamembrán, endoszóma eredetű transzmembrán, vagy GPI-kapcsolt (glikozil-foszfatidil-inozitol) fehérjék (pl. CD81, CD63, CD9, CD41), 2) membránhoz asszociált citoplazmatikus fehérjék (pl. TSG101, ALIX), 3) ko-izolált, szennyező partikulumok fehérjei (pl. ApoB, albumin). Az EV-kben felhalmozódó lipidek kimutatása is alkalmas lehet az EV jelenlétének validálására. Az AnnexinV kalcium függő, míg a laktadherin kalcium független módon képes az externalizálódott foszfátidil-szerinhez (PS-hez) kapcsolódni [13].

- Az egyedi EV-k jellemzése

A teljes EV tartalom mellett az egyedi EV-k jellemzése többlet információt adhat. Képekalkító technikával, például elektronmikroszkóppal, atomerő mikroszkóppal, szuperrezolúciós mikroszkóppal közeli és átnézeti képet készíthetünk. A kísérleti kérdéstől függően szükség lehet nagy áteresztőképességű módszerek alkalmazására is. A részecskék Brown mozgását követve a nanopartikulum követő analízis (Nanopartikulum Tracking Analyses, NTA) egyedi EV detektálást tesz lehetővé, bár a mért paramétereket populációs szinten mutatja be. Továbbá a nanorészecskék mérésére optimalizált, magas érzékenységű áramlási citométerrel (pl. Apogee Flow Systems) lehetőségünk adódik az egyedi részecskék jellemzésére méret és EV marker expresszió alapján.

3. Az extracelluláris vezikulák disztribúciója

Mivel a molekulák az EV-kben membránnal vannak körülvéve, viszonylag védve vannak a külső behatásokkal szemben. Az alacsony immunogenitásuk és toxicitásuk

révén felmerült annak lehetősége, hogy mint biokompatibilis, nanoméretű gyógyszer hordozó rendszereknek használjuk őket [14]. Az EV alapú terápia fejlesztéséhez kulcsfontosságú az EV-k farmakokinetikai paramétereit megismerni intravénás injektlást követően. Ebben az esetben az EV-k biohasznosulását kétlépéses modellel írhatjuk le, melyek: 1) disztribúció és 2) elimináció. Az EV-k kezdetben gyorsan eloszlanak a szervezetben. A vérplazma EV tartalma percek alatt harmadára, fél órában belül az eredeti EV mennyiség 1,8-3,3 %-ra, majd egy óra után a detektálhatósági szint alá csökken [15,16]. Az EV-k degradációjának mértéke a vérkeringésben, valamint a veséken keresztül történő kiválasztásuk elhanyagolható, így ezen mechanizmusok nem okozhatják a keringő EV koncentráció gyors csökkenését [15].

Az EV disztribúciós vizsgálatok módszertana rendkívül szerteágazó. A választott modell organizmusok, az EV-k mérete és forrása, az EV injektlás útja, az injektlás után a detektálásig eltelt idő, a vizsgált szervek és a detektálás módja eltérő lehet. Leggyakrabban egér és patkány törzseken, 1-24 órával az intravénás injektlást követően vizsgálják az sEV-k (ritkábban mEV-k) disztribúcióját *in situ*, vagy a szervek eltávolítását követően *ex vivo* [16]. Az sEV-k főképp a májban és a tüdőben halmozódnak fel, de kisebb mértékben a lépben és a vesékben is történik sEV akkumuláció. Bár az mEV-kre vonatkozó adatok száma csekély, hasonló eloszlási mintázatot mutatnak [16].

A második lépés az EV-k eliminációja, ami lassabb, és felezési ideje hosszabb. A máj, a tüdő, a lép és a vesék jó vérellátottságú, fejlett fagocita rendszerrel rendelkező szervek. A vérkeringésből a szöveti rezidens és a monocita eredetű makrofágok hatékonyan távolítják el az EV-ket. Általánosságban elmondható, hogy a nanopartikulumok viselkedését *in vivo* befolyásolhatja a méretük, felszíni töltésük, membránjuk és a fehérje koronájuk összetétele. Az sEV-k opszonizációja antitestek, komplement fehérjék révén kevésbé hatékony [17] és méretükből adódóan könnyebben penetrálnak az egyes szövetekbe [18,19]. Az EV-k külső felszíne polianionos, nagy mennyiségben tartalmaz negatív töltést hordozó PS-t, amely elősegíti a scavenger receptor mediált EV fagocitózist [20]. Amennyiben negatív töltésű, PS-ben gazdag liposzóma kezelés előzte meg az EV injekciót, az EV-k eliminációja, májban történő akkumulációja jelentősen lecsökkent. Ezzel szemben a negatív töltést nem hordozó foszfatidil-kolin gazdag liposzóma nem befolyásolta az EV disztribúciót [20]. A membrán lipid összetétele mellett az integráns és a felszínhez asszociált fehérjék egyaránt meghatározhatják az EV-k tropizmusát. A

membránban jelen lévő $\alpha_v\beta_5$ integrin a májba, a Kupffer sejtekhez míg az $\alpha_6\beta_4$ és az $\alpha_6\beta_1$ felszíni kifejeződése a tüdő felé irányítja az EV-ket [21]. A veszettség vírus glikoprotein az acetilkolin receptorhoz való magas affinitása miatt az agyba juttatja el az EV-ket [22]. A komplementszabályozó molekulát (pl. CD55 és CD59) vagy „ne egyél meg” szignált hordozó (pl. CD47) EV-knek magasabb a felezési ideje [23,24]. Az EV-k felszínéhez kötődő, szekretált fehérjék, például a WNT és TGF- β 1 az így létrehozott fehérje korona részeként képes befolyásolni az EV-k viselkedését [25,26].

Az EV-k *in vivo* nyomon követésére számos megközelítést alkalmazhatunk. A legfontosabbakat említve: az izolált EV-ket megjelölhetjük direkt módon fluoreszcens, lipofil festékekkel (pl. PKH26/67, DiD és DiR) vagy radioaktív izotóppal (pl. ^{99m}Tc -HMPAO és [$^{111}\text{indium}$]). Egy másik lehetőség, hogy sejtmérnökség révén módosított sejtekkel előállíthatunk lumineszcens/ fluoreszcens fehérjét expresszáló EV-ket [15]. A fent említett jelölésekkel ellátott EV-ket optikai vagy nukleáris képalkotó eljárásokkal tudjuk *in vivo* nyomon követni. Az optikai képalkotás felhasználhatósága limitált, az emlős szövetek magas háttér fluoreszcenciája csökkenti a detektálás szenzitivitását. Továbbá a szövetek fényelnyelése és szórása is jelentős, melynek következtében a fluoreszcens/ lumineszcens festékek szöveti penetrációs mélysége alacsony. Ezzel szemben a nukleáris képalkotás pontosabb EV követést tesz lehetővé, jobb penetrációval és kvantitatív elemzéssel rendelkezik [15]. A nukleáris képalkotáshoz használt egyfoton-emissziós tomográfiával (SPECT) vagy pozitronemissziós tomográfiával (PET) kombinált komputertomográfia (CT) lehetővé teszi, hogy egy időben anatómiai és funkcionális információkat gyűjtsünk. Varga és munkatársai javasolták elsőként a ^{99m}Tc -trikarbonil használatát az EV-k radioizotópos direkt jelölésére [27]. A ^{99m}Tc -trikarbonil komplex számos aminosavhoz képes hozzákapcsolódni pl. hisztidin, metionin és cisztein [28]. Így az EV membránfehérjéihez kapcsolódva válik lehetővé az EV-k direkt jelölése. A vörösvértest eredetű EV-k esetén $38,8 \pm 6,2$ % jelölési hatékonyságot sikerült elérni ezzel a módszerrel [27]. A vörösvértest eredetű EV mintákra magas EV szám (10^{11} - 10^{12} /ml), emellett a szabad fehérjék alacsony koncentrációja jellemző. A szabad fehérje mennyiség növekedésével a jelölési hatékonyság drasztikusan lecsökken, hiszen a ^{99m}Tc -trikarbonil komplex a membránfehérjéken kívül a szabad fehérjéket is megköti. Ennek kiküszöbölésére duramicin vegyületet használhatunk. A duramicin egy 19 aminosavból álló peptid, amely magas affinitással és specificitással képes a foszfatidil-etanolaminhoz

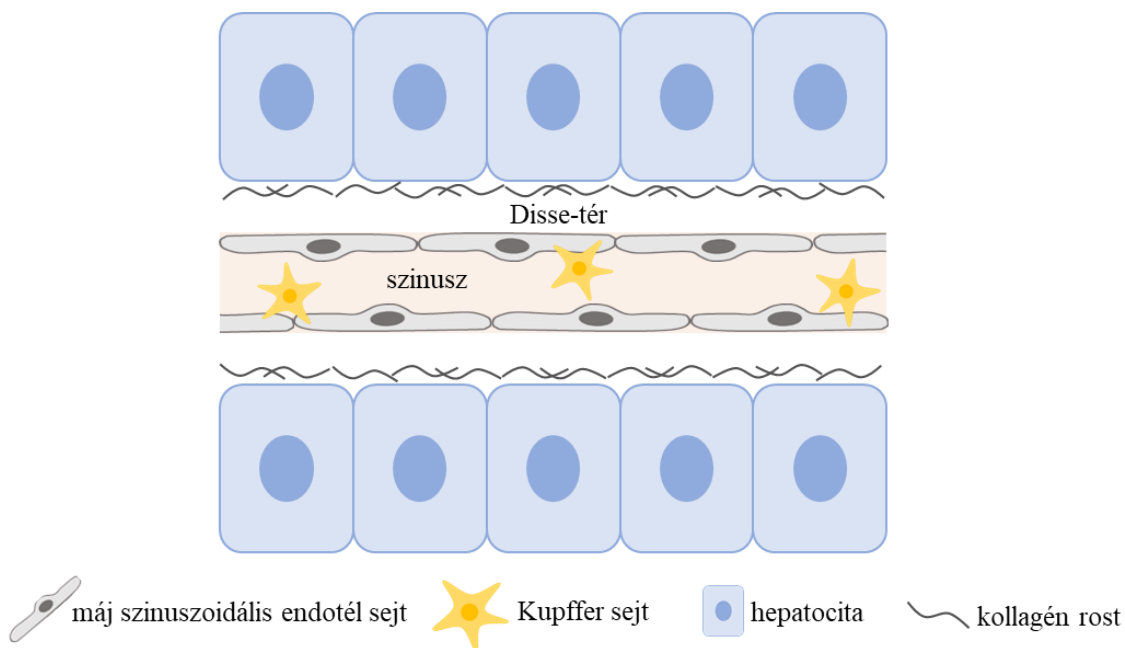
(PE) kötődni [29]. A PE a második leggyakoribb foszfolipid, összességében az emlős sejtek lipid tartalmának 20 %-át teszi ki. Az EV-k gazdagok PE-ben, így a duramicin az EV-k jelölésére is alkalmas. ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin előnye a ^{99m}Tc -trikarbonil komplexhez képest, hogy a szabad fehérjékhez nem kapcsolódik. Továbbá a membránfehérjék szerkezete változatlan marad, így nem befolyásolja jelentősen az EV-k szerkezetét és eloszlását.

4. A máj felépítése és funkciói

A máj a legnagyobb szervünk, központi szerepet játszik a metabolikus egyensúly fenntartásában. A szervezet összfehérje termelésének 15 %-áért felelős, ennek nagy részét az albumin és egyéb transzport, koagulációs és fibrinolitikus fehérjék teszik ki. A fehérjék és glikoproteinek lebontása során keletkező toxikus ammóniát ureává alakítja, amely a veséken keresztül a vizelettel ürül ki a szervezetből. Hozzájárul az optimális vércukorszint fenntartásához. Táplálkozást követően a felesleges glükózt glikogén szintézisre használja fel. Rövidtávú éhezési periódusban a glikogénből glikogenolízissel, hosszútávú éhezés során az aminosavakból vagy egyéb prekursorokból (pl. tejsav) glükoneogenezis révén glükózt állít elő. A máj által termelt epe elősegíti a gyógyszerek, toxinok, anyagcsere melléktermékek, a koleszterin és a bilirubin exkrécióját. Emellett, az epesavak biztosítják a táplálékból származó zsírok és zsírolékony vitaminok emulzifikációját a vékonybélben. A máj közreműködik a szervezet koleszterin és lipoprotein metabolizmusában, amelyet a „Lipidanyagcsere” című fejezetben részletesebben ismertetek [30].

A máj parenchima többféle sejtípust tartalmaz. Körülbelül 80 %-át a hepatociták, 10 %-át a máj szinuszoidális endotél sejtek (LSEC-k), 5 %-át a limfociták, 4 %-át a Kupffer sejtek (makrofágok) és 1-3 %-át a biliáris epitel sejtek alkotják. A hepatociták egysejt vastagságú elágazó és anasztomizáló rétegekbe rendeződnek. A bazális membránjuk a szinusz felé néz (**3. ábra**). A szinuszokban kevert vér áramlik. A máj egyedülálló módon kettős vérrellátással rendelkezik: 25 %-a a máj artériából ered, 75 %-a részben oxigénszegény, tápanyagban gazdag vért szállít a portális véna felől a májszövetbe. A szinuszok falát speciális fenesztrált endotélium alkotja, amely elősegíti a hepatociták és a vér közötti anyagtranszportot. A hepatociták és az LSEC-k között fekszik a Disse-tér

(3. ábra). A Disse-térben találhatjuk meg a máj csillagsejteket, amelyek részt vesznek extracelluláris mátrix komponensek (pl. 4-es típusú kollagén, laminin stb.) termelésében. A máj fagocitotikus rendszerének központi szereplői a Kupffer sejtek, amelyek döntően a szinuszok lumenében helyezkednek el (3. ábra) [30].



3. ábra: A máj szöveti szerkezete.
(saját ábra)

Habár a máj elsődleges funkciói között általában nem említjük, a szinuszokban számos immunfolyamat zajlik. A máj nagyszámú rezidens immunsejtet tartalmaz és a hepatociták termelik a veleszületett immunrendszer keringő fehérjéinek 80-90 %-át. A máj scavenger receptor expressziója kiemelkedően magas a szervezetben, ezért könnyen kiszűri az idegen molekulákat, patogéneket a vérkeringésből. Ezen receptorok kifejeződése meglepő módon nem csak a Kupffer sejtekre korlátozódik, hanem az LSEC-kre is, ezért ez utóbbit scavenger endotéliumként is hívják [31]. A scavenger receptor családban számos szerkezetileg és biológiai funkciót tekintve diverz fehérjét találunk. Ligandjaik döntően polianionos jellegűek: lehetnek endogén (pl. LDL), módosított endogén (pl. acetilált-LDL) és exogén kórokozó (pl. LPS) eredetűek is. Polianionos jellegükből adódóan az EV-k is potenciális ligandjai a scavenger receptoroknak. Környezetükből pinocitózissal hatékonyan felveszik az oldott, kisméretű partikulumokat ($<0,23 \mu\text{m}$) is, amelyet a citoplazmájukban megtalálható nagyszámú endoszóma bizonyít. A hepatikus

scavenger rendszer telítődésekor vagy a Kupffer sejtek deplécióját követően az LSEC-k (és a hepatociták is) képesek lehetnek a nagyobb ($>0,23\ \mu\text{m}$) partikulumok fagocitózisára [32].

5. Lipidanyagcsere

5.1 Lipoproteinek

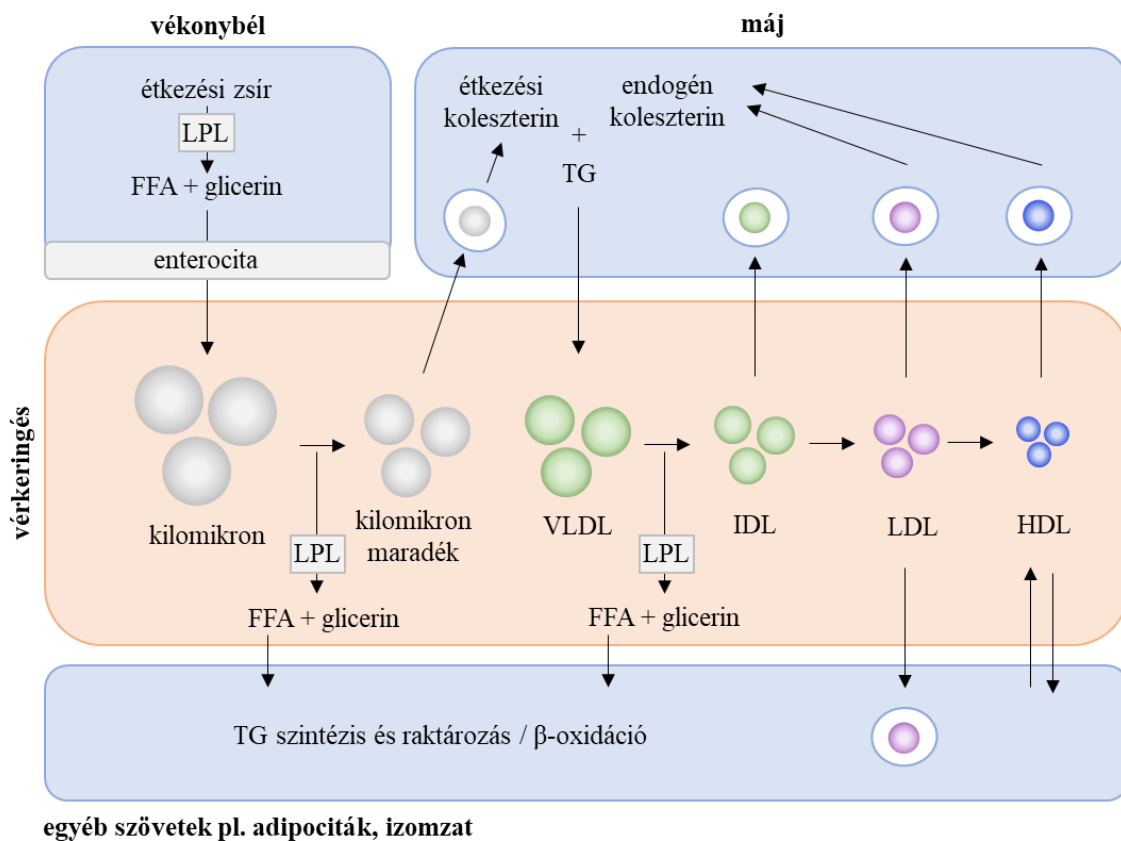
A szervezetben a rossz vízoldhatóságuk miatt az apoláris lipidek: szabad zsírsavak (FFA), trigliceridek (TG), koleszterin és koleszterin-észterek lipoproteinek formájában szállítódnak. A koleszterin-észtert és TG-t tartalmazó központi hidrofób régiót amfipatikus, egyrétegű membrán veszi körül, amely foszfolipidekből, szabad koleszterinből és apolipoproteinekből áll. Az apolipoproteinek szerepet játszanak a lipoproteinek szerkezetének stabilizálásában, javítják vízoldhatóságát és meghatározzák az eloszlásukat és felvételüket a vérkeringésből [33]. A lipoproteineket hét csoportra oszthatjuk lipid és fehérje összetételük alapján (**2. táblázat**). A lipoproteinek anyagcseréjét a **4. ábra** foglalja össze.

2. táblázat: Lipoproteinek csoportosítása és jellemzői.

(Kenneth RF, 2021 munkája alapján készített táblázat)

Lipoprotein	Sűrűség (g/ml)	Méret (nm)	Fő lipid alkotó	Fő apolipoprotein
kilomikron	$<0,930$	75-1200	trigliceridek	ApoB-48, Apo-C, Apo-E, Apo-A1, A-H, A-IV
kilomikron maradvány	$0,930 - 1,006$	30-80	trigliceridek koleszterin	ApoB-48, Apo-E
VLDL	$0,930 - 1,006$	30-80	trigliceridek	ApoB-100, Apo-E, Apo-C
IDL	$1,006 - 1,019$	25-35	trigliceridek koleszterin	ApoB-100, Apo-E, Apo-C
LDL	$1,019 - 1,063$	18-25	koleszterin	ApoB-100
HDL	$1,063 - 1,210$	5-12	koleszterin foszfolipidek	ApoA-I, ApoA-II, Apo-C, Apo-E
Lp(a)	$1,055 - 1,085$	~ 30	koleszterin	ApoB-100, Apo(a)

A táplálékból származó lipidek 95 %-át a TG-ek, 5 %-át a koleszterin, FFA-k és foszfolipidek alkotják [34]. A TG-et a vékonybélben, epesavak jelenlétében a pankréász-lipáz enzim FFA-ra és glicerinnre bontja. Az így keletkezett molekulákat az enterociták veszik fel, majd belőlük az endoplazmás retikulumban újra TG-t hoznak létre, amelyet a koleszterinnel együtt kilomikronba csomagolnak. A kilomikronok a nyirokba, majd a mellúri nyirokvezetéken keresztül a vérkeringésbe jutnak. A felszínükhöz asszociált ApoC aktiválja az izom- és zsírsejtek lipoprotein lipáz (LPL) enzimeit. A felszabadult FFA-kat a sejtek β -oxidáción keresztül energia szükségletük fedezésére használják, vagy TG formájában zsírcseppekben raktározzák. Az említett folyamatok hatására a kilomikron TG tartalma csökken és a kialakuló kilomikron maradékokat a vérkeringésből a máj távolítja el, ApoE-receptor mediált endocitózissal [33]. A májban a TG-ek és koleszterin-észterek az ApoB-100⁺, nagyon alacsony sűrűségű lipoproteinekbe (VLDL) épülnek be, majd szekrécióra kerülnek. A VLDL partikulumok extrahepatikus szövetekhez jutnak, ahol a membránban lévő LPL-k révén FFA tartalmuk felszabadul és bejut a sejtbe. A VLDL TG koncentrációja folyamatosan csökken, melynek eredményeként létrejönnek az átmeneti sűrűségű lipoproteinek (IDL) [33]. A TG-et tovább hidrolizálják a hepatociták membránjában elhelyezkedő hepatikus lipázok, aminek következtében alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) jönnek létre. Az extrahepatikus szövetek vagy a máj felveszi az LDL partikulumokat az LDL receptor (LDLR) segítségével, a lipoproteinekben fennmaradt koleszterint pedig a HDL eljuttatja a májba vagy a perifériás szövetekbe (pl. szteroid szintetizáló szövetek) [33].



4. ábra: A lipoproteinek anyagcseréje.
(saját ábra)

5.2 PCSK9 szerepe a szervezet lipidanyagcseréjében

A proprotein-konvertáz szubtilizin/kexin 9 (PCSK9) fehérje kulcsszerepet játszik a vérplazma koleszterin tartalmának szabályozásában. A PCSK9 a hepatociták által nagy mennyiségben termelt, szolubilis fehérje, melynek elsőként felfedezett célpontja az LDLR [35]. A PCSK9 az LDLR extracelluláris, recirkulációjáért felelős doménjéhez kötődik. A PCSK9-LDLR komplex internalizációját követően az endoszóma savas pH értékének következményeként a PCSK9 LDLR kötő affinitása megnő, ami az LDLR-t a lizoszómákba irányítja [36,37]. A PCSK9 funkciónyeréses mutációja esetén lecsökken az LDLR szintje, ezzel párhuzamosan nő a vérplazma LDL koncentrációja és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának valószínűsége (familiáris hiperkoleszterinémia) [38]. Funkcióvesztéses mutáció esetén az LDLR fehérje szintje nő, a vérplazma LDL szintje csökken, ami kardioprotektív hatással bír [39]. Ugyanakkor a májsejtekben felhalmozódó zsírmennyiség nő, ami lipotoxikus lehet a hepatociták

számára. Az *Ldlr* és a *Pcsk9* génexpressziója is a SREBP2 (szterol szabályozó elemeket megkötő fehérje 2) transzkripciós faktor szabályozása alatt áll. Amennyiben csökken a sejt koleszterin tartalma, a SREBP2 aktiválódik és ez fokozza a két gén aktivitását, emellett növeli a VLDL szekréciót. Ennek fiziológias szerepe valószínűleg az, hogy a PCSK9 ideiglenesen gátolja a VLDL partikulumok felvételét az LDLR-on keresztül, így azok eljuthatnak a perifériás szövetekhez [40].

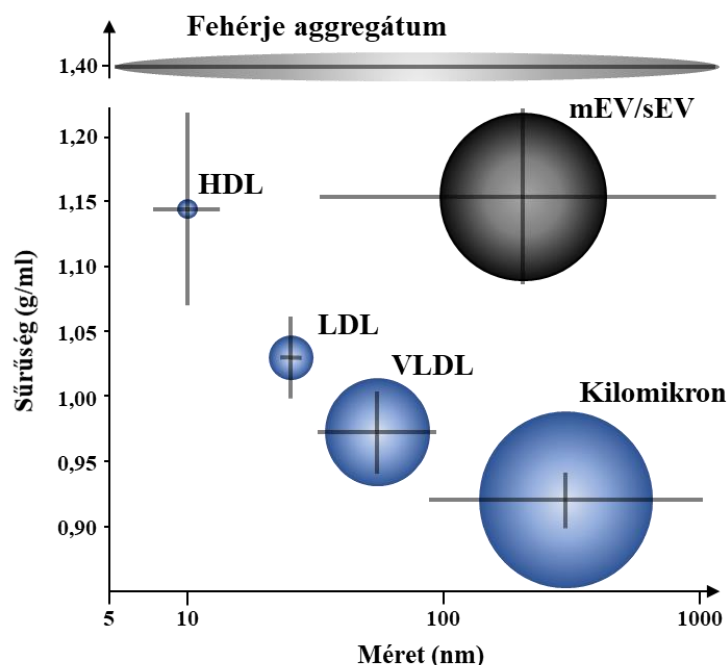
A PCSK9 fehérje hiánya úgy tűnik nem jár semmilyen káros mellékhatással [41]. Ezért a PCSK9 új terápiás célpontot jelenthet a koleszterincsökkentő gyógyszerek esetén. Jelenleg kis molekula nem, csak két antitest alapú készítmény érhető el: név szerint az evolocumab és az alirocumab. Mindkét készítmény 60 %-al lecsökkentette a vér LDL szintjét [42].

Az elmúlt években az LDLR-on kívül egyéb receptorokat is felfedeztek, amelyhez a PCSK9 fehérje képes kapcsolódni, például VLDLR, ApoER2, LRP1, CD81 és CD36 [43]. A CD36 központi szerepet játszik a máj FFA felvételében és a TG-ek tárolásában. Magas szintje hozzájárul a zsírmáj és a hepatikus inzulin rezisztencia kialakulásához. Továbbá a CD36-mediálta FFA felvétel endoplazmás retikulum stresszhez és lipotoxicitáshoz vezethet adipocitákban, kardiomiocitákban, hepatocitákban, endotél sejtekben, makrofágokban, pankreász β sejtekben, podocitákban és idegsejtekben [44]. A CD36 nem mutat szerkezeti homológiát az LDLR-ral, hiányzik az EGFA régió (epidermális növekedési faktor A domén), ami a PCSK9 kötő pozíciójának megfelelő domén. Ennek ellenére, a PCSK9 kötési affinitása a CD36 fehérjéhez neutrális pH-n ($K_d=1,2 \mu\text{mol/l}$) megközelíti az LDLR fehérjénél mért értékeket ($K_d=0,09-0,9 \mu\text{mol/l}$) [45]. Ezek alapján a PCSK9-nek protektív szerepe lehet a nem-alkoholos zsírmáj (NAFLD) és a nem-alkoholos szteatohepatitisz kialakulásával szemben is.

5.3 Lipoproteinek és az EV-k kapcsolata az izolálás szempontjából

A lipoproteinek és az EV-k számos biofizikai tulajdonsága átfed (**5. ábra**). Az EV-k és a HDL sűrűsége közel azonos (1,08-1,21 g/ml), ezzel szemben a kilomikron, a VLDL, az LDL és az IDL partikulumok sűrűsége alacsonyabb ($<1,06 \text{ g/ml}$). Egy egészséges ember plazmájában a lipoproteinek koncentrációja ($10^{16}/\text{ml}$) jelentősen meghaladja az EV-k mennyiségét ($10^7-10^9/\text{ml}$). Ez azért is lényeges, mert a nagyságrendekkel magasabb

plazma lipoprotein tartalom miatt az izolált EV frakció lipoprotein szennyezettsége akkor is jelentős marad, ha az EV szeparálás során arányaiban sok lipoprotein partikulumot el tudunk távolítani. Amennyiben sűrűség alapján szeparáljuk az EV-ket, a tiszta frakció nem lesz HDL és LDL mentes, mert a ma használt grádiens centrifugálási módszerekkel az említett három komponens nem választható szét egymástól [46]. Méret alapú elválasztás esetén a VLDL ko-izolációja jelenthet problémát. Az említett metodikai nehézség akkor is tapasztalható, amikor differenciál ultracentrifugálást kombinálunk qEV méretkizárásos kromatográfiás (SEC) tisztítással [47]. A VLDL ko-izolációja csökkenthető, ha éhomi vérvétel után végezzük méréseinket, hiszen az étkezést követően a VLDL koncentrációja jelentősen megnövekszik a plazmában [48]. Kutatócsoportunk eredményei alapján a lipoproteinek nem csupán szennyező részecskékként lehetnek jelen az EV frakciókban. Kimutattuk, hogy az LDL kapcsolódik az EV-k felszínéhez, melynek funkcionális jelentősége lehet [47]. Továbbá sikerült bizonyítanunk, hogy a plazmában az EV-k felszínén fehérje korona alakul ki, amely szintén tartalmazza az ApoB fehérjét, így valószínűleg természetes alkotója az EV-k fehérje koronájának [49].



5. ábra: A lipoproteinek és EV-k összehasonlítása sűrűség és méret alapján.
(Simonsen JB, 2017 munkája alapján készített ábra)

5.4 Hiperlipidémia

Az Egyesült Államokban és az Európai Unióban hiperlipidémiával diagnosztizált felnőttek száma meghaladja a 3 milliót. A hiperlipidémia megváltozott vér lipid szinttel (átlagnál magasabb LDL-K, összkoleszterin, TG, alacsonyabb HDL-K koncentráció) jellemezhető [50]. Oka lehet genetikai (primer hiperlipidémia), vagy szerzett tényezőkre visszavezethető (szekunder hiperlipidémia). A legtöbb páciensnél kevert hiperlipidémiáról van szó: a betegség poligénis öröklődést mutat, manifesztációját egyértelműen befolyásolják külső faktorok, mint az elhízás, fokozott telített zsírsav bevitel, magas koleszterin tartalmú táplálkozás, stb [50]. Az elhízással kapcsolatos vizsgálatokban a zsírok mellett egyéb makrotápanyagok, a fehérjék és a szénhidrátok szerepét is figyelembe kell venni. Hu és munkatársai 29 különböző összetételű táp hizlaló hatását vizsgálták egerekben. Megfigyelésük szerint a táp zsírtartalma befolyásolja a test zsírtömegét, viszont a fehérjék és szénhidrátok szerepe elhanyagolható. A magas zsírtartalmú tápokból történő fokozott energia bevitel a hipotalamuszban lévő dopamin, opoid és az 5-HT (5-hidroxi-triptamin) receptorrendszer stimulációjával volt összefüggésben. Ezen adatok szerint a túlzott táplálékbevitel oka táplálékzsír hatására kialakuló hipotalamusz stimuláció, amely felülírja a homeosztatikus kontrollt [51].

A nyugati típusú táplálkozás szimulálására számos magas zsírtartalmú diéta (high fat diet, HFD) elérhető kísérleti célokra. Egy tipikus humán amerikai és európai diéta energiatartalmának 36-40 %-a zsírokból származik, de ez az érték 50-60 %-ra növelhető magas zsírtartalmú táplálkozás esetén. A 60 %-os HFD a rágcsálóknál jóval nagyobb, zsírokból származó energia bevitt jelent a normál rágcsáló táphoz viszonyítva (10 %). Ha a humán, nyugati típusú táplálkozáshoz hasonló, rágcsáló modellt szeretnénk létrehozni, általában 45 %-os HFD tápot választunk [52].

Normolipémiás körülmények között a máj nem raktároz nagyobb mennyiségű TG-t (<5 %). A zsírsavak nagy része a TG gazdag VLDL formájában, vagy zsírsav oxidáció révén távozik a májból. Amennyiben a hepatociták által felvett FFA-k mennyisége meghaladja ezen folyamatok kapacitását, fokozódik a máj lipid akkumulációja [53]. A táplálékból származó telített és telítetlen zsírsavak mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya egyaránt befolyásolja a hiperlipidémiával asszociált szövődmények kialakulását. A táplálékkal bevitt zsírsavak mennyisége és minősége meghatározza a vérplazma FFA

tartalmát. A vérplazmában leggyakrabban előforduló zsírsavak az olajsav (OA, 31 %) és a palmitinsav (PA, 27%) [54]. Továbbá humán vizsgálatok alapján a nem-alkoholos zsírmáj kórképben a máj nagy mennyiségben halmozza fel a fent említett zsírsavakat [55]. Az egyszeresen telítetlen OA hatékonyan beépül a TG-kbe, míg a telített PA lipotoxikus, nem vezet TG akkumulációhoz, a sejtekben apoptózist indukál. Kettős kezelés esetében az OA protektív hatással bír: segíti a PA integrálódását a lipidcseppekbe. A TG-k PA tartalmának növekedésével csökken annak toxicitása, a sejtek életképessége nő. Az alacsony OA/PA arány rosszabb prognózist jelent, míg a magasabb hányados nem progresszív máj szteatózist eredményezhet. Amennyiben a TG szintézis gátolt vagy az FFA koncentráció meghaladja a sejt TG szintetizáló kapacitását, az OA is toxikus hatást mutat. Ez direkt bizonyítékként szolgál, hogy a TG akkumuláció protektív hatással bír [56].

A TG az FFA-k neutrális raktározó formája, önmagában nem lipotoxikus. Azonban az FFA-k bioaktív DG-kbe és szfingolipidekbe (pl. ceramidok) is beépülhetnek. A DG-k intermediereként szolgálnak komplex lipidek szintéziséhez (pl. TG és PS). Hírvivő molekulaként szerepük a jelátviteli folyamatokban is kiemelkedő. A membrán kötött foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát hidrolízis révén DG-dé alakulhat, amely képes aktiválni a protein kináz C izoformákat. Ennek eredményeként többek között hozzájárulhat a lipid indukált hepatikus inzulin rezisztenciához [57]. A szfingolipidek, amellett, hogy fontos membránalkotók szintén részt vesznek a sejtek jelátviteli folyamataiban. A szfingolipidek közé tartozó ceramidok általánosságban befolyásolhatják a sejthalál, sejtdifferenciáció, proliferáció és gyulladás folyamatait. Továbbá hozzájárulhatnak az inzulin-asszociált betegségek kialakulásához, úgy mint a nem-alkoholos zsírmáj, inzulin rezisztencia és a II-es típusú diabétesz [58–60].

5.5 Hiperlipidémia hatása a máj EV termelésére

A máj 80 %-át a parenchimális sejtek alkotják. Jelentős tömegük miatt a hepatocita eredetű EV-k központi szerepet játszanak a máj anyagcseréjének szabályozásában. Normolipémiás körülmények között elősegítik a májsejtek túlélését és proliferációját. Hiperlipidémiás körülmények között a szekretált EV-k összetétele és mennyisége megváltozik, amellyel hozzájárulhatnak a lipotoxicitás asszociált kórképek

progressziójához. Nem-alkoholos zsírmáj egér modellben és humán pácienseknél is bizonyították, hogy a megnövekedett keringő EV-k döntő többségben a hepatocitákból származnak [61].

A lipotoxikus körülmények több ismert útvonalon is fokozhatják az EV szekréciót. Ilyen például az endoszómális, ESCRT (szállításhoz szükséges endoszómális válogató komplex) mediált útvonal. A TSG101 fehérje az ESCRT-I komplex részeként elősegíti az intralumináris vezikulák kialakulását. A vezikulák lumenében a TSG101 felhalmozódik, így felhasználhatjuk az endoszómális eredetű sEV-k azonosítására. A nem-alkoholos zsírmáj egér modellben a májból izolált primer hepatociták TSG101⁺ sEV termelése jelentősen megnőtt a kontroll mintákhoz viszonyítva [62]. Humán vizsgálatokban, NASH pácienseknél is sikerült kimutatni a TSG101⁺ sEV-k mennyiségi növekedését [63]. A DR5-ROCK1 (halál receptor 5 – Rho-asszociált fehérje kináz 1) jelátviteli útvonal központi szerepet játszik a lipid indukált apoptózisban. A DR5 fehérje mennyisége normolipémiás körülmények között alacsony, expressziója lipid akkumuláció hatására nem csupán megemelkedik, hanem a toxikus lipidek jelenléte miatt ligand független módon aktiválódhat [64]. A fentiek mellett, a túlzott FFA felvétel hatására kialakuló endoplazmatikus retikulum (ER) stressz is szabályozza az EV-k felszabadulását. Az ER stresszre adott sejtválaszban az IRE1 α (szerin/treonin-fehérje kináz/endoribonukleáz 1 α) transzkripciós faktor aktivitása fokozódik, amely EV szekrécióhoz vezet. Az IRE1 α deficiens sejtekben csökken az FFA indukált EV felszabadulás [65]. Ezt a jelenséget *in vivo* is sikerült bizonyítani. Magas zsír, fruktóz és koleszterin tartalmú diéta fokozza az IRE1 α jelátviteli útvonal működését, és a keringő, hepatocita eredetű EV-k mennyiségét. A májra specifikus IRE1 α knockout egereknél ez a jelenség nem volt tapasztalható [66]. A lizofoszfatidilkolin aktivált JNK-MLK3 (c-Jun N-terminális kináz-vegyes vonalú kináz 3) útvonal is részt vesz az EV termelés fokozásában. *In vivo* és *in vitro* egyaránt sikerült igazolni a jelenséget a JNK blokkolásával [67].

II. Célkitűzés

Munkánk során a máj lipid metabolizmusát, EV termelését és felvételét vizsgáltuk normolipémiás és hiperlipidémiás körülmények között.

1. Krónikus (20 hét) HFD segítségével hiperlipidémiás egér modellt hoztunk létre. Az egerek plazmájából származó mintákból megvizsgáltuk az apolipoproteinek, lipid homeosztázissal kapcsolatos gének, sEV-k, mEV-k mennyiségét, az egerek májából pedig a hiperlipidémiás egerekre jellemző lipidprofil. A következő kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan változik az egerek testtömege, glükóz toleranciája és a plazma LDL/VLDL és HDL koleszterinszintje?
- Hogyan befolyásolja a krónikus HFD a máj lipid összetételét?
- Hogyan változik a máj *Pcsk9*, *Anxa2*, *Cd36* és *Ldlr* mRNS és fehérje expressziója?
- Hogyan változik a plazma mEV és sEV szintje krónikus HFD hatására?
- Van-e összefüggés a plazma EV és a máj lipid tartalma között?

2. Az EV-k disztribúciójának vizsgálatához optimalizáltuk az EV-k ^{99m}Tc -HYNIC-duramicinnel történő jelölését, majd a következő kérdésre kerestük a választ:

- Milyen *in vivo* eloszlást mutat a ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin jelölt HEK293T-palmGFP eredetű mEV és sEV egérben?

3. Következő lépésben az FFA kezelés hatását vizsgáltuk a májsejtek EV termelésére és felvételére.

- Primer májsejt kultúrában megvizsgáltuk, hogy FFA kezelés hatására hogyan változik az mEV-k és az sEV-k termelése?
- Hepatocita mono- és hepatocita-NPC ko-kultúrában megvizsgáltuk, hogy milyen májsejtek veszik fel az mEV-ket és az sEV-ket és erre milyen hatása van az FFA kezelésnek?

III. Módszerek

1. Állatkísérletek

Állatkísérleteinket az Európai Unió 86/609/EEC irányelvei alapján terveztük, amelyet a Semmelweis Egyetem, Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága is jóváhagyott (PE/EA/1655-7/2018). A hím, C57BL/6 egereket szabályozott körülmények között, állandó hőmérsékleten (25 °C), normál fény ciklus mellett (12-12 óra) tartottuk. A táplálékhoz és vízhez korlátlan, igény szerinti hozzáférést biztosítottunk. Az egereket hat hetes korukban két csoportra osztottuk, majd 20 hétig magas zsírtartalmú (HFD, 45 kcal% zsír, D12451, Research Diets, USA) vagy normál rágcsáló tápon tartottuk. A **3. táblázat**ban látható, az általunk használt kontroll és 45 kcal% HFD rágcsáló tápok összetétele. A HFD tápban a fő zsírforrás a disznózsír, amelyben a telített zsírsavak közül a palmitinsav (PA, C16:0) és sztearinsav (C18:0), telítetlen zsírsavak közül az olajsav (OA, C18:1) és linolsav (C18:2) dominanciája jellemző [68].

3. táblázat: A kontroll és 45 kcal% HFD táp összetétele.

	kontroll táp (10 kcal% zsír)	HFD táp (45 kcal% zsír)
fehérje	19,20%	23,70%
szénhidrát	66,70%	40,70%
rost	4,70%	5,80%
zsír	4,30%	23,6% (87,7% disznózsír)
egyéb	5,00%	6,20%
disznózsír fő zsírsav alkotói		
zsírsav	jelölés	FFA tartalom
palmitinsav	C16:0	27,9 % m/m
sztearinsav	C18:0	16,1 % m/m
olajsav	C18:1	34,2 % m/m
linolsav	C18:2	14,4 % m/m

A kísérleti időszakban az egerek testtömegét rendszeresen, két hetente megmértük. A HFD/normál diétát követően az egereket 5 órán keresztül éhezettük, majd glükóz tolerancia tesztet végeztünk. Az intraperitoneális glükóz injekciót megelőzően, illetve azt követően a 30. és 90. percben megmértük Dcont Ideal készülékkel (Dcont,

Magyarország) a vér glükóz szintjét. Másnap, újabb táplálékmegevonást követően az egereket CO₂-vel termináltuk. A hasüreget felnyitottuk és a vena cava inferior-ból a teljes test vérmennyiségét fecskendővel összegyűjtöttük, és savas citrát-dextróz véralvadásgátló oldatot tartalmazó csőbe tettük. A vér alakos elemeinek ülepedésével vérplazmát izoláltunk (1500 g, 15 perc), melynek LDL/VLDL és HDL szintjét HDL és LDL/VLDL Quantification Kit (Sigma, USA) segítségével határoztuk meg. A májból 0,5-1 cm³ méretű szövetmintákat vettünk, melyeket folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottunk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

2. A máj génexpressziójának vizsgálata kvantitatív PCR-rel

A máj génexpressziójának vizsgálatához 40-50 mg májszövetből teljes RNS-t izoláltunk. Micropestle pálcával (Geneaid, Taiwan) QIAzol lízis pufferben (QIAGEN, Németország) homogenizáltuk a szövetet, majd az RNS-t Blood/Cell Total RNA Mini Kit-tel (Geneaid, Taiwan) izoláltuk, a gyártói utasítás szerint. A minták RNS tartalmát NanoDrop spektrométerrel (ThermoFisher, USA) határoztuk meg. A cDNS-t 1 µg RNS-ből SensiFAST cDNA Synthesis Kittel állítottuk elő (Bioline, UK). A valós idejű kvantitatív PCR-t SensiFAST Probe Hi-ROX Kittel (Bioline, UK), 7900 HT Fast Real-Time PCR készülék (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztük el a gyártói utasítások szerint. Összesen 50 ng cDNS mintát amplifikáltunk 10 µl végtérfogatban 0,5 µl Taqman assay és 5 µl SensiFAST Probe Hi-ROX mix jelenléte mellett. A következő Taqman próbákat használtuk: *Gapdh* (Mm9999915_g1), *Cd36* (Mm00432403_m1), *Ldlr* (Mm01177349_m1), *Pcsk9* (Mm01263609_g1) és *Anxa2* (Mm00500307_m1). A génexpresszió változásának mértékét 2^{-ΔΔCt} módszer segítségével, *Gapdh* belső kontroll használatával állapítottuk meg.

3. A máj PCSK9 fehérje tartalmának meghatározása

A máj szolubilis PCSK9 fehérje szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg. A fehérje lizátumot a LEGEND MAXTM Mouse PCSK9 ELISA Kit (BioLegend, USA) gyártói javaslata alapján készítettünk el. Folyékony nitrogénben lefagyasztott májszövetet proteáz inhibitorral (Complete Protease Inhibitor with EDTA, Sigma, USA) kiegészített,

hideg PBS-ben homogenizáltunk micropestle pálca és fecskendő segítségével. A visszamaradó nagyobb szöveti darabokat centrifugálással távolítottuk el (10.000 g, 15 perc, 4 °C). A minták fehérje tartalmát Micro BCA módszerrel (ThermoFisher, USA) határoztuk meg.

4. A máj CD36, LDLR és ANXA2 fehérje tartalmának meghatározása

A máj LDLR, CD36 és ANXA2 szintjét Western blottal határoztuk meg. A májlizátum elkészítésénél 15-25 mg szövetből indultunk ki. A proteáz inhibitorokkal (Complete Protease Inhibitor, EDTA-free, Sigma, USA) kiegészített lízis pufferben (Cell Lysis Buffer, CellSignaling, USA) micropestle pálcával és fecskendővel homogenizáltuk a szövet darabkákat. A mintákat fél órán keresztül inkubáltuk jégen, melyeket rendszeresen maximum fordulatszámon vortexeltük (30 rpm). Lehűtött szonikátorban 10 percig szonikáltuk a lizátumokat, majd a 14.500 g-n 10 percig 4 °C-on eltávolítottuk a nem lizálódott szöveti darabokat. A felülúszót a lebegő zsírréteget elkerülve leszívtuk, és a minták fehérje tartalmát Micro BCA módszerrel (ThermoFisher, USA) meghatároztuk.

A fehérjéket 10 %-os poliakrilamid gélen (akrilamid/bisakrilamid arány 37,5:1) méretük alapján elválasztottuk MiniProtean (BioRad, USA) gélfuttató rendszer segítségével. A membránfehérjék könnyebb szolubilizációjának érdekében a fehérje mintákat azonos térfogatú 0,1 %-os TritonX®-100 és Leammli pufferral kevertünk össze. A gél zsebeibe mintánként 30 µg fehérjét töltöttünk. Az elektroforetikus szeparációt követően a fehérjéket polivinilidén fluorid membránra (Serva, Németország) juttattuk. A membránt 5 %-os zsírszegény tejjel blokkoltuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, folyamatos forgatás mellett. Az elsődleges antitesteket 5 %-os zsírszegény tejporban oldva, egy éjszakán át inkubáltuk a membránnal, 4 °C-on, folyamatos forgatás mellett. A következő antitesteket használtuk: monoklonális egér anti-CD36 (1:500, D-2712) (ThermoFisher, USA), monoklonális nyúl anti-LDLR (1:1.000, SJ0197) (ThermoFisher, USA), monoklonális nyúl anti-ANXA2 (1:1000, JA42-30) (ThermoFisher, USA) és poliklonális nyúl anti-aktin (1:2.000) (Sigma, USA). A szabad elsődleges antitest eltávolítását követően 1 %-os zsírszegény tejporban oldott torma-peroxidázzal jelölt poliklonális anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos antitestekkel (Abcam, UK, 1:20.000) inkubáltuk a membránokat 40 percen keresztül, szobahőmérsékleten. A torma-peroxidáz

szubsztrátként ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher, USA) oldatot használtunk. A kemilumineszcens szignált Imager CHEMI Premium (VWR, USA) képanalizáló rendszer segítségével detektáltuk. A kapott csíkok optikai denzitását ImageJ programmal értékeltük. Az egyes értékeket az aktin belső kontroll fehérjére normalizáltuk.

5. A máj lipidomikai vizsgálata HPLC-MS/MS segítségével

A lipidomikai vizsgálatokhoz 1-2 mg tömegű szövetmintát használtunk, melyekből fehérje koncentrációt, ceramid, DG és TG koncentrációt mértünk.

A fehérje koncentráció meghatározásához a szövetmintát lízis pufferben vettük fel, amely 0,1 % SDS-t, 5 mM EDTA-t, 150 mM NaCl-t, 50 mM Tris-t, 1 % Tween 20-at, 1 mM Na_3VO_4 -t, 1 mM PMSF-t, 10 mM benzamidint, 20 mM NaF-t, 1 mM pNPP-t és proteáz gátló koktélt tartalmazott. A lizátumokat lecentrifugáltuk (10 perc, 10.000 rpm, 4 °C). A felülúszó fehérje koncentrációját Pierce BCA módszerrel (ThermoFisher, USA) határoztuk meg.

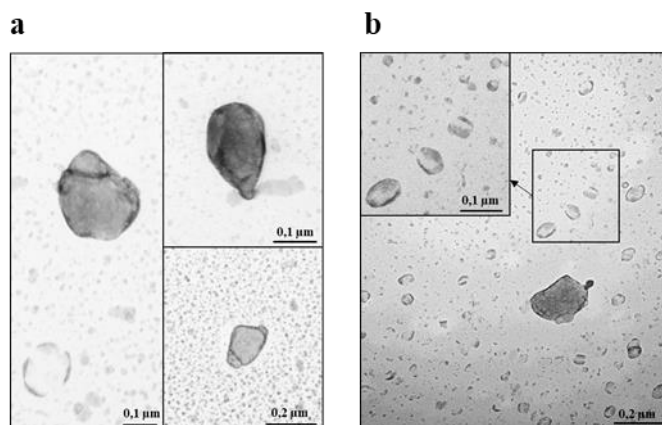
A HPLC-MS/MS analízishez a szövetmintát ceramid 17:0, belső standardot (50 ng/ml) tartalmazó metanol oldatban reszuszpendáltuk. A minták lízisét ultrahangos homogenizálóval segítettük elő. Centrifugálást követően a HPLC-MS/MS analízishez a felülúszót használtuk fel.

Tíz μl oldatot injektáltunk Series200 Autosampler HPLC készülékbe (Perkin Elmer, Olaszország). A vizsgálat során az egyes lipid frakciókat gradiens mentén metanollal (A mozgó fázis) és ammónium-acetáttal (10 mM, B mozgó fázis) eluáltuk Kinetex 5 μm , C8 100Å, LC (100x3 mm) oszlopon: 0 perc 90 % A, 1 perc 90 % A, 9 perc 95 % A, 10,5 perc 98 % A, 11,5 perc 98 % A, 12 perc 90 % A, 14 perc 90 % A. A ceramidok, DG-k és TG-k koncentrációját hármass kvadrupól tömegspektrométerrel határoztuk meg (Applied Biosystems MDS SCIEX 4000 QTRAP, Sciex, USA). A műszert pozitív többcsatornás reakciókövetés módban használtuk. A mérést 400 °C-os ionpermet és 5500V feszültség érték mellett végeztük el.

6. Plazma eredetű EV-k szeparálása

A kontroll és HFD egerek plazmájából EV-t szeparáltunk. Az egereket 5 óra táplálékmegvonást követően CO₂ kamrában termináltuk. A hasüreget felnyitottuk, majd vena cava inferior-ból fecskendő segítségével összegyűjtöttük a teljes vérmennyiséget. Véralvasztógátlóként savas citrát-dextróz oldatot használtunk, amely korábbi eredményeink alapján gátolja az *in vitro* vezikulációt [69]. A vér alakos elemeinek üleptetésével plazmát izoláltunk (1.500 g, 15 perc) [70]. A plazma mintákat folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk és felhasználásig –80 °C-on tároltuk.

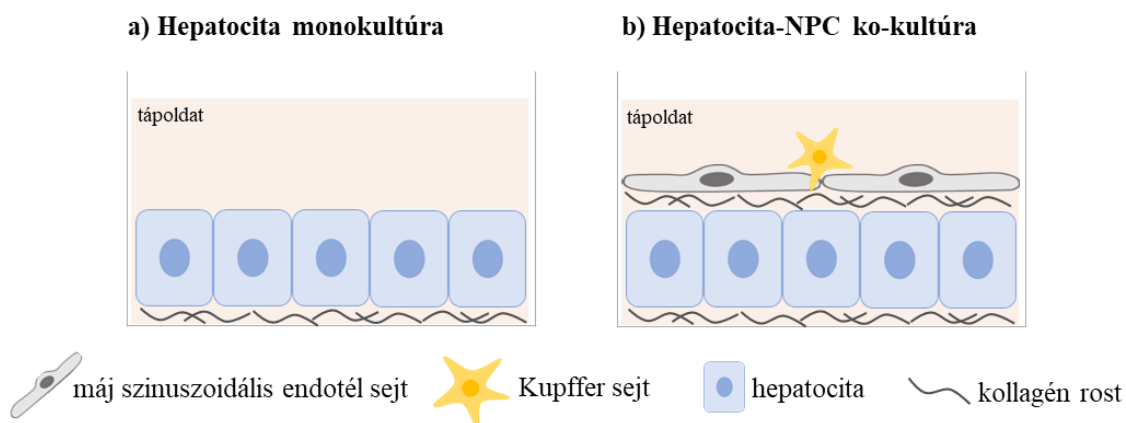
Az EV-eket SEC-kel kombinált differenciál ultracentrifugálással szeparáltuk. A viszkozitás csökkentése érdekében a felolvasztott plazma mintákat kétszeresére hígítottuk 0,2 µm szűrt PBS-sel. Első lépésben a centrifugális erő növelésével elkülönítettük a sejtörmelékeket, lEV-eket (2.000 g, 30 perc, 4 °C), mEV-eket (12.500 g, 40 perc, 4 °C) és sEV-eket (100.000 g, 70 perc, 4 °C). Az mEV és sEV pelletet 500 µl 0,2 µm szűrt PBS-ben vettük fel. Az EV-eket SEC oszloppal tisztítottuk tovább. Az oszlopot átmostuk PBS-sel, majd 500 µl-ben felvittük a mintákat. A gyártó utasításai szerint 1,5 ml poolozott EV frakciót gyűjtöttünk. Az EV frakciókat aliquotokra osztottuk, majd folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk és felhasználásig –80 °C-on tároltuk. Fagyasztást követően az EV-k jelenlétét áramlási citometriával és NTA-val igazoltuk. A választott EV szeparálási módszer hatékonyságát transzmissziós elektron mikroszkóppal is igazoltuk kontroll minták felhasználásával (6. ábra).



6. ábra: Kontroll plazma eredetű mEV (a) és sEV (b) elektronmikroszkópos képe.

7. *In vitro* kísérletekben használt sejtkultúrák modellek

A máj funkciók vizsgálatához két lépéses kollagenáz perfúzióval izolálhatunk májsejteket. Első lépésben kalcium mentes, kalcium kelátot tartalmazó oldattal mossuk át a májat. A kalcium ionok eltávolításával az intercelluláris sejtkapcsoló struktúrák szerkezete felbomlik, így a sejt-sejt kapcsolatok megszüntethetők. A második lépésben kollagenáz alkalmazásával az extracelluláris mátrix megemészthető. Végeredményképpen a sejtek könnyedén „kirázhatók” a máj kötőszövetes tokjából. Az izolálást *in situ* végezzük és az állat saját keringési rendszerét használjuk fel az oldatok áramoltatásához a portális vénán keresztül (anterográd perfúzió) [71]. A hepatociták izolálást követően szuszpenzióban rövid ideig életképesek és sejtkultúrában pár napon belül de-differenciálódnak. Ez a jelenség nagy valószínűséggel a máj specifikus transzkripciós faktor expressziójának csökkenése miatt történik meg. Különböző sejtenyésző médium kiegészítők (pl. növekedési faktorok, hormonok), illetve extracelluláris mátrix fehérjék (pl. kollagén) jelenlétében a hepatociták differenciált állapota hosszabb ideig fenntartható. Funkcionális vizsgálatokkal (pl. albumin termelés) ellenőrizhetjük a sejtkultúra állapotát [72]. Bár a hepatociták alkotják a máj nagy részét és ellátják az elsődleges funkcióit, optimális működésükhöz szükséges a nem parenchimális sejtek (NPC, pl. Kupffer sejt és LSEC) jelenléte. Ebből adódóan a ko-kultúrák kialakítása jobban modellezi az *in vivo* állapotot. A hepatociták mérete és sűrűsége nagyobb az NPC-khez viszonyítva, így differenciál centrifugálással könnyen elválaszthatók. Kísérleteink során hepatocita monokultúrát és hepatocita-NPC ko-kultúrát használtunk modell rendszerként (7/a és 7/b ábra).



7. ábra: Kísérleteinkben használt primer májsejtenyészetek.
(saját ábra)

7.1 Primer májsejtek izolálása

A C57BL/6, hím egerek testtömegükre viszonyított mennyiségű, intraperitoneálisan injektált ketamin-xilazin keverékkel lettek altatva. A májsejteket anterográd, két lépéses kollagenáz perfúzióval izoláltuk F. Carbal és munkatársai munkája alapján [71]. A kísérletek során 0,2 µm pórusátmérőjű membránszűrővel szűrt oldatokkal, steril infúziós szerelék és 70 %-os alkoholban fertőtlenített műtéti eszközök használatával biztosítottuk az aszeptikus körülményeket. Az előmelegített (42 °C, Precision GP05 Wather Bath, ThermoFisher, USA), oxigénnel dúsított (VisionAire5 oxygen concentrator, AirSep Corporation, USA) perfúziós oldatokkal, 4 ml/perc sebességgel (EP-1 Econo pump, BioRad, USA) átmostuk a májat. Első lépésben 0,5 M EGTA-val (Ca^{2+} kelátor) kiegészített PBS-sel felbontottuk a sejtek közötti dezmoszómális kapcsolatokat. Ezt követően a sejtek kötőszövethez való kapcsolódását IV-es típusú kollagenázt (0,3 mg/mL, Worthington, USA) tartalmazó oldattal (3,9 g/l NaCl, 0,5 g/l KCl, 0,7 g/l CaCl_2 , 50 mM HEPES) megszüntettük. A perfundált májat kiemeltük, a külső kötőszövetes tokot felnyitottuk, a májsejteket hideg DMEM oldatban „kiráztuk”, végül a szöveti maradványokat 100 µm-es szűrővel eltávolítottuk (Miltenyi Biotec, Németország).

7.2 Hepatocita monokultúra

A perfúzióval nyert májsejt szuszpenziót alacsony centrifugálási erővel ülepitettük (50 g, 4 °C, 3 perc). A centrifugálást követően a felülúszót jégre félreraktuk NPC izoláláshoz. A sejt üledéket 40 %-os Percoll (Sigma, USA) oldatban reszuszpendáltuk. Centrifugálást (150 g, 7 perc, 4 °C) követően az oldat felszínén úszó, alacsonyabb sűrűségű halott sejteket eltávolítottuk. A parenchimális sejtek életképességét tripánkék festéssel, hemocitóméter segítségével ellenőriztük. 85 %-os életképesség felett a hepatocitákat I-es típusú kollagénnel bevont sejtenyészti lemezekre ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma, USA), a májsejtek fenntartására optimalizált sejtenyészti médiumban (DMEM (magas glükóz tartalmú, 4,5 g/l), 10 % főtális marha szérum (FBS, Gibco), 1.000 U/l penicillin, 1.000 µg/l streptomycin, 2 mmol/l L-glutamin, 7,5 mg/l Hidrokortizon, 0,02 mg/l epidermális növekedési faktor, 0,014 mg/l glukagon, 1 mM nátrium-piruvát, 0,5 ml/l inzulin (Sigma, USA)) tenyésztettük. Az EV felvétel vizsgálatához 24 lyukú- ($1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk), EV

termelés analíziséhez 6 lyukú sejtenyészítő lemezeket (1×10^6 sejt/lyuk) használtunk. A sejtek letapadását mikroszkóppal ellenőriztük, a le nem tapadt sejteket mosással eltávolítottuk. A hepatocitákat morfológiájuk alapján azonosítottuk: nagy méretű, kuboidális sejtek, egy vagy két centrálisan elhelyezkedő sejtmaggal. A sejteket FBS mentes májsejt tenyészítő médiumban tenyésztettük tovább.

7.3 Hepatocita-NPC ko-kultúra

A hepatocitákat a „Hepatocita monokultúra” című fejezetben leírtak szerint izoláltuk. A hepatocitákat egy órán keresztül hagytuk letapadni az I-es típusú kollagénnel fedett, 24-lyukú tenyészítő lemez felszínére ($1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk). A letapadt sejteket egy órán keresztül PBS-ben oldott I-es típusú kollagénnel inkubáltuk ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), ezzel létrehozva egy kollagén-hepatocita-kollagén szendvics kultúrát. Mialatt a kollagént hagytuk leülepedni, a félretett hepatocita felülűszóból NPC sejteket izoláltunk differenciál centrifugálással (300 g, 10 perc, 4°C). Az élő sejteket 33 %-os Percoll oldattal szeparáltuk, majd a visszamaradó élő hepatocitákat további centrifugálási lépésekkel eltávolítottuk (1. 50 g, 3 perc, 4°C ; 2. 70 g, 3 perc, 4°C). Az NPC-k életképességét tripánkék festéssel, hemocitóméterrel ellenőriztük. 90 %-os életképesség felett az NPC-eket a kollagén-hepatocita-kollagénnel szendvics kultúrára rétegeztük 1×10^5 sejt/lyuk koncentrációban FBS mentes májsejt tenyészítő táplében. Két óra inkubációt követően a tápoldatot lecseréltük és a le nem tapadt sejteket eltávolítottuk.

8. Immuncitokémia

A hepatocita-NPC ko-kultúrában a sejteket I-es típusú kollagénnel bevont fedőlemezen (12 mm, VWR, USA) tenyésztettük az izolálást követően 16 órán keresztül. A sejteket 4 %-os PBS-ben oldott paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk. A mintákat 5 % FBS tartalmú PBS-sel blokkoltuk, amit intracelluláris jelölés esetében TritonX-100-zal (0,3 %) egészítettünk ki. A ko-kultúrában tenyésztett sejteket sejt-specifikus markerekkel, direkt vagy indirekt jelöléssel azonosítottuk: a hepatocitákat az albumin termelés, a Kupffer sejteket az F4/80 expresszió és az LSEC-eket a CD146 pozitivitás alapján. A mintát az elsődleges antitestekkel egy éjszakán keresztül, 4°C -on, 5 % FBS jelenlétében

inkubáltuk. A következő antitesteket használtuk: poliklonális nyúl anti-humán szérum albumin (1:100), monoklonális patkány anti-F4/80-eF660 (1:100, BM8) és monoklonális egér anti-CD146 (1:100, P1H12) (ThermoFisher, USA). A nem kötődött antitesteket PBS-sel történő mosással eltávolítottuk, majd az albumin és CD146 esetében a másodlagos antitestekkel (poliklonális kecske anti-nyúl IgG-AF700, 1:100; poliklonális kecske anti-egér IgG-eF570, 1:100; ThermoFisher, USA) két órán keresztül inkubáltuk a mintákat 37 °C-on, rázatás mellett. A sejteket PBS-sel és desztillált vízzel mostuk, majd lefedtük DAPI-val kiegészített ProLongTM Gold antifade reagenssel (ThermoFisher, USA). A lemezeket Leica TCS SP8 konfokális lézer szkennings mikroszkóppal vizsgáltuk (Leica, Németország).

9. Kezelés szabad zsírsavakkal

A hiperlipidémiás körülményeket *in vitro* 16 órás FFA kezeléssel modelleztük. A kezeléshez az *in vivo* kísérletekhez használt HFD tápban domináló OA és PA, 2:1 arányú elegyét választottuk. Az OA-t és PA-t 10 % BSA tartalmú DMEM oldatban oldottuk fel, egy éjszakán át tartó forgatás mellett (10 rpm, FisherbrandTM MiniTube Rotator, ThermoFisher, USA). A törzsoldatokat tovább hígítottuk FBS mentes tápoldattal, hogy a végkoncentráció 400 μ M OA és 200 μ M PA legyen.

10. Olajvörös festés

A májsejtek lipid akkumulációját olajvörös (Sigma, USA) festéssel vizsgáltuk. A sejteket 4 %-os PBS-ben oldott PFA-val fixáltuk. PBS-sel történő mosást követően a lipidcseppeket 60 %-os olajvörös festékkel jelöltük. A festék felesleget PBS-sel és desztillált vízzel történő mosással távolítottuk el. A sejteket Nikon Diaphot TMD Inverted Mikroszkóppal vizsgáltuk (Nikon, Japán). Az olajvörössel festett lipidcseppek relatív méretét ImageJ programmal határoztuk meg.

11. Albumin és húgysav termelés vizsgálata

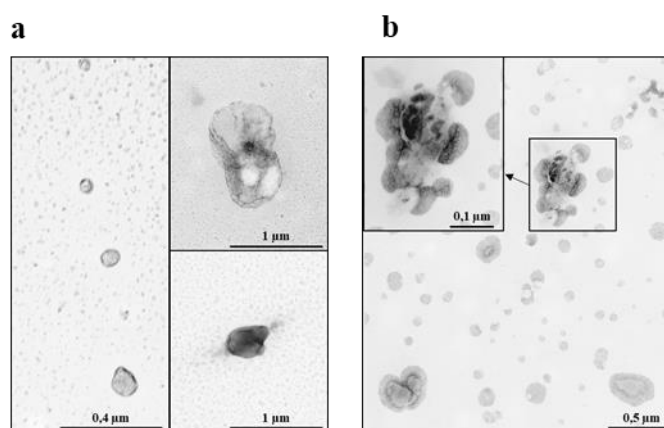
A hepatociták albumin termelését a kondicionált médiumból Mouse Albumin ELISA Kit (Abcam, UK) segítségével mértük. A húgysav koncentrációt Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit-tel (ThermoFisher, USA) határoztuk meg.

12. Májsejtek citokin termelésének vizsgálata

A májsejtek citokin termelését LEGENDplex™ Mouse Macrophage/Microglia Panel 13-plex (BioLegend, USA) kittel vizsgáltuk. A CXCL1, a TGF- β 1, az IL-18, az IL-23, a CCL22, az IL-10, az IL-12, az IL-6, a TNF- α , a G-CSF, a CCL17 és az IL-1 β koncentrációját a tenyésztett májsejtek felülszójából határoztuk meg. A méréseket CytoFLEX S (Beckman Coulter, USA) áramlási citométerrel végeztük.

13. Hepatocita eredetű EV-k szeparálása

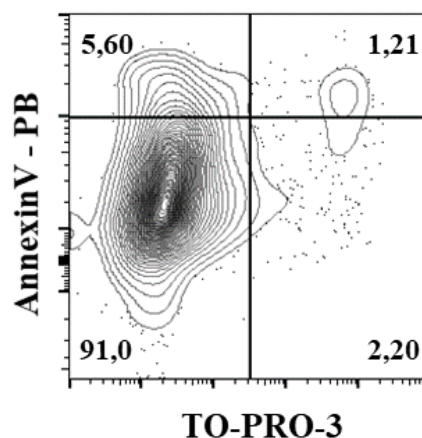
Az EV-eket 24 órával az FBS megvonást követően 5×10^6 kontroll és 5×10^6 FFA kezelt sejt kondicionált médiumból szeparáltuk. A plazma eredetű EV-k szeparálásánál ismertett módszert választottuk (lásd „Plazma eredetű EV-k szeparálása” című fejezet) kis módosításokkal. A 2000 g centrifugálást megelőzően a sejteket 300 g, 20 °C 10 perces centrifugálással és szűréssel (5 μ m, Millipore, USA) távolítottuk el. Az EV frakciókat aliquotokra osztottuk, majd folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk és felhasználásig –80 °C-on tároltuk. Fagyasztást követően az EV-k jelenlétét áramlási citometriával és NTA-val igazoltuk. A választott EV szeparálási módszer hatékonyságát TEM-mel is igazoltuk kontroll minták felhasználásával (**8. ábra**).



8. ábra: Kontroll hepatocita eredetű mEV (a) és sEV (b) elektronmikroszkópos képe.

14. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k szeparálása

A HEK293T-palmGFP sejteket 10 % FBS, 1000 U/l penicillin, 1000 μg/l sztreptomycin, 2 mmol/l L-glutamin és 1 g/l glükóz tartalmú DMEM tápoldatban tenyésztettük. A sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ koncentráció és magas páratartalom mellett tartottuk fenn. A sejtenyészet Mycoplasma státuszát rendszeresen ellenőriztük. A kondicionált médiumot 24 órával FBS megvonást követően gyűjtöttük össze nyolc T-175 kezelt felületű sejtenyésztő edényből. A passage szám 8 és 18 közé esett, a sejtenyészet 70-80 %-os konfluenciát ért el, ami körülbelül $131,7 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^6$ sejtet jelentett szeparálásonként. Tripánkék festés alapján a sejtek életképessége $90,1 \pm 2,0$ % volt. Az élő, apoptotikus és halott sejtek arányát áramlási citométerrel határoztuk meg. A sejteket Annexin-kötő pufferben (10 mM HEPES, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂) AnnexinV-PB (1:200, Sony Biotechnology, USA) festék jelenlétében inkubáltuk 15 percig, szobahőmérsékleten. Mérést megelőzően közvetlenül TO-PRO-3 életképességi festéket adtunk a sejtszuszpenzióhoz (1:3000, ThermoFisher, USA). CytoFLEX S készüléken 10.000 eseményt mértünk le. Eredményeink alapján az apoptotizáló sejtek aránya 7 % alatt volt (9. ábra).



9. ábra: A HEK293T-palmGFP életképességének vizsgálata áramlási citométerrel 24 órával a szérum mentesítést követően

Az EV szeparálás során a kondicionált médiumot lecentrifugáltuk 300 g-n, 4 °C-on 10 percig, majd 5 µm-es szűrővel (Millipore, USA) eltávolítottuk a visszamaradó sejteket. Az lEV-ket 2.000 g-n, 4 °C-on 30 perc alatt leülepítettük. A felülúszóból az mEV-ket 12.500 g-n, 4 °C-on 40 percig szeparáltuk. A felülúszót koncentráltuk és tovább tisztítottuk TFF-Easy (pórusméret: 20 nm, HansaBioMed, Észtország) készülékkel, majd 100.000 g-n 4 °C-on 70 percig leülepítettük az sEV-ket. Szeparálást követően az EV frakciókat 0,2 µm szűrt PBS-ben reszuszpendáltuk, az aliquotokat folyékony nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Fagyasztást követően az EV-k jelenlétét TEM-mel, áramlási citometriával és NTA-val igazoltuk.

15. Az EV minták karakterizálása MISEV2018 irányelvei alapján

15.1 Az EV minták vizsgálata TEM-mel

Az EV-k morfológiáját TEM-mel vizsgáltuk. A mintákat apróbb módosításokkal, Théry és munkatársainak munkája alapján készítettük elő [73]. 2-3 µl mintát ráhelyeztük formvar bevont rácokra (Sigma, USA), majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A maradék oldatot eltávolítottuk, majd fixáltuk 10 percig 2 %-os glutáraldehiddel. A rácokat háromszor 5 percig mostuk, majd a kontrasztot uranil oxaláttal megnöveltük. A mintákat tovább kontrasztoltuk és beágyaztuk 4 % uranil acetát és 2 % metil cellulóz keverékében. A mintákat JEOL 1011 TEM-mel (Japán) vizsgáltuk.

A HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k/sEV-k CD63, CD81 expresszióját immun-TEM módszerrel is vizsgáltuk. 2-3 µl mintát ráhelyeztük formvar bevont rácokra, majd 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A maradék oldatot eltávolítottuk, majd 4 % PFA-val fixáltuk a mintákat. A rácokat háromszor 5 percig mostuk 50 mM glicin-t tartalmazó PBS-sel, blokkoló reagensként 2 %-os szacharóz oldatot használtunk. Az elsődleges antitesteket (poliklonális nyúl anti-CD63, 1:50, Sigma, USA; monoklonális egér anti-CD81, 1.3.3.22, 1:50, ThermoFisher, USA) egy éjszakán keresztül, 4 °C-on inkubáltuk a lemezekkel. A rácokat háromszor mostuk blokkoló oldattal, majd másodlagos antitestekkel (poliklonális kecske anti-nyúl IgG-10 nm arany kolloid, Abcam, UK; poliklonális kecske anti-egér IgG-5 nm arany kolloid, Sigma, USA) inkubáltuk a rácokat 1 órán keresztül szobahőn. A mintákat háromszor mostuk blokkoló

oldattal és PBS-sel, majd utófixáltunk 2 %-os glutáraldehiddel. Vizes mosást követően a korábban ismertetett metil-cellulózos eljárással beágyasztuk és növeltük a minta kontrasztját. A mintákat JEOL 1011 TEM-mel (Japán) vizsgáltuk.

15.2 Az EV-k nanopartikulum követési vizsgálata

Az EV-k méreteloszlását NTA segítségével vizsgáltuk. A mérést ZetaView PMX-120 készülékkel, ZetaVIEW szoftver segítségével hajtottuk végre. A mérés beállított paramétereit a **4. táblázat** mutatja.

4. táblázat: Az NTA mérés paramétereit.

	mEV	sEV
szenzitivitás	60	85
zár	100	100
képváltási frekvencia	7,5	30
pozíciók száma	11	11
ciklusok száma	2	2
min. fényesség	20	20
min. méret (nm)	5	5
max. méret (nm)	1000	1000
hőmérséklet (°C)	25	25

15.3 Az EV-k fehérje és lipid tartalmának meghatározása

A fehérje koncentrációt Micro BCA módszer (ThermoFisher, USA) segítségével határoztuk meg, amelyhez az EV mintákat 3-4 fagyasztási-olvasztási ciklussal és szonikálással (10 perc, 4 °C) készítettük elő. A lipid tartalmat Visnovitz és munkatársai által optimalizált szulfo-foszfo-vanillin lipid assay módszerrel mértük meg [74]. Az EV felvétellel kapcsolatos vizsgálatainkban a kezelésre használt EV mennyiséget lipid tartalomra normalizáltunk.

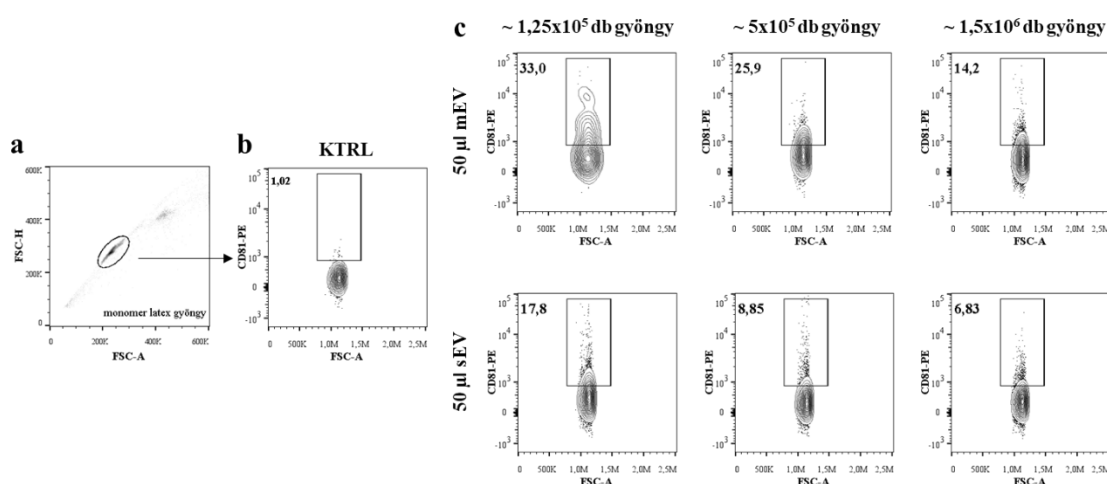
15.4 Az EV-k áramlási citométerrel történő vizsgálata

Az EV asszociált markereket áramlási citométerrel detektáltuk. A HEK293T-palmGFP-, a plazma- és a hepatocita-eredetű EV-ket latex gyöngyökhöz (3 μm , 4% w/v Aldehyde/Sulfate Latex Beads, ThermoFisher, USA) kötöttük egy éjszakán keresztül 4 °C-on, forgatás mellett (10 rpm, Fisherbrand™ MiniTube Rotator, ThermoFisher, USA). Ezt követően a gyöngyök felszínét két lépésben blokkoltuk: 100 mM glicinnel, majd 2,5 w/v % BSA oldattal. Ezután az EV-ket direkt és indirekt eljárással, EV marker specifikus antitestekkel vagy AnnexinV peptiddel jelöltük. A jelölést követően 5.000 eseményt mértünk le CytoFLEX S áramlási citométerrel (Beckman Coulter, USA). Az adatokat FlowJo szoftverrel elemeztük (Becton Dickinson, USA). Kiértékelés során az FSC-H és az FSC-A értékek alapján kikapuztuk a monomer latex gyöngyöket (**10/a ábra**). A kapun belül antitesttel vagy AnnexinV peptiddel inkubált, blokkolt felületű gyöngy kontrollhoz hasonlítottuk az EV-vel fedett gyöngyök EV marker expresszióját (**10/b ábra**).

A HEK293T-palmGFP eredetű mintáknál 1 μg lipid tartalmú mEV-t vagy sEV-t inkubáltunk $\sim 7,5 \times 10^5$ db latex gyönggyel. Az EV-ket a következő reagensekkel jelöltük: AnnexinV-AF647 (1:100, SONY Biot., USA), monoklonális egér anti-humán CD63-PerCP (1:100, MEM-259, ThermoFisher, USA), monoklonális egér anti-humán CD81-PerCP/Cy5,5 (1:100, 5A6, SONY Biot., USA), monoklonális egér anti-humán CD9-APC (1:100, HI9a, SONY Biot., USA), monoklonális egér anti-humán ApoB (1:100, A-6, SantaCruz, USA) poliklonális kecske anti-egér IgG-eF570 (1:100, ThermoFisher, USA) antitesttel jelölve.

Keringő EV minták esetében meghatároztuk az optimális EV/latex gyöngy arányt. Az előkísérlethez kontroll egér plazmából szeparált mEV-t és sEV-t használtunk fel. Azonos térfogatú (50 μl), poolozott SEC frakciót inkubáltunk $\sim 1,25 \times 10^5$, $\sim 5 \times 10^5$ vagy $\sim 1,5 \times 10^6$ db latex gyönggyel. Az EV-k jelenlétét CD81 marker segítségével detektáltuk. A gyöngyök mennyiségével fordított arányban csökkent a pozitív gyöngyök aránya. Mivel a legkisebb gyöngy mennyiségnél sem láttunk telítést az $1,25 \times 10^5$ gyöngy/ 50 μl koncentrációt választottuk az plazma eredetű EV-k vizsgálatához (**10/c ábra**). A hepatocita eredetű mEV-k és sEV-k esetében is ezt az arányt alkalmaztuk. Az előkísérletünk alapján a plazma és a hepatocita eredetű EV-k esetében azonos térfogatú (200 μl), poolozott SEC frakciót inkubáltuk $\sim 5 \times 10^5$ db gyönggyel. Plazma/hepatocita

eredetű EV-ket AnnexinV-PB (1:100, SONY Biot., USA), monoklonális patkány anti-egér CD63-APC (1:200, NVG-2, SONY Biot., USA), monoklonális hörcsög anti-egér CD81-PE (1:400, EAT-2, SONY Biot., USA), egér anti-humán monoklonális ApoB (1:100, A-6, SantaCruz, USA) poliklonális kecske anti-egér IgG-eF570 (1:100, ThermoFisher, USA) antitesttel jelölve. A gyöngyök %-os pozitivitása mellett a relatív átlag fluoreszcencia intenzitást is meghatároztuk, amely plusz információt adhat az egy gyöngyhez asszociált partikulumok számáról.



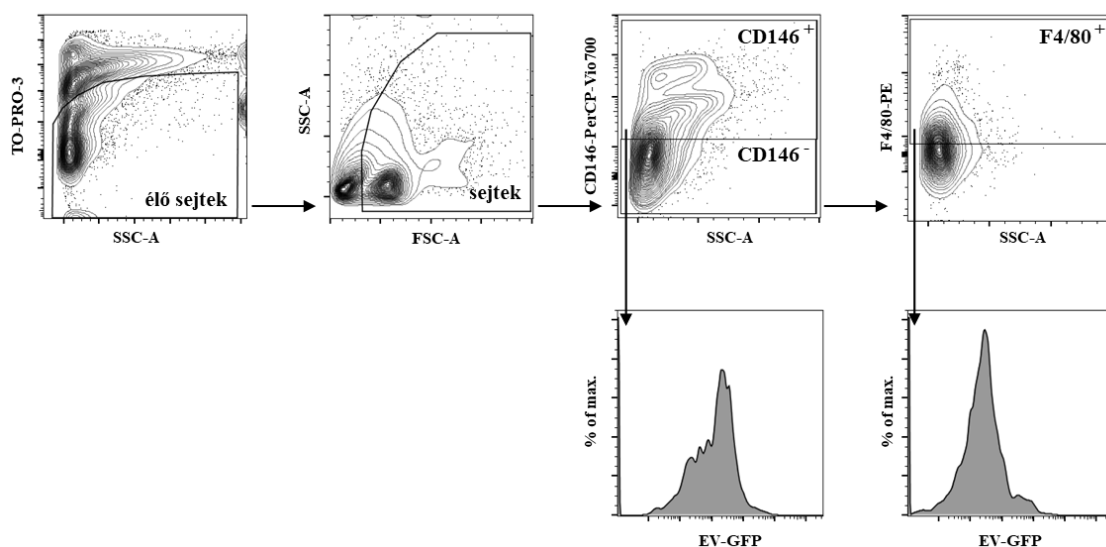
10. ábra: A latex gyöngy alapú mérések kiértékelése (a és b) és az optimális keringő EV/latex gyöngy arány meghatározása (c).

15.5 EV fluoreszcenciájának detektálása FOBI készülék segítségével

A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k GFP fluoreszcenciáját FOBI (fluoreszcencia alapú teljes test képalkotás) készülékkel demonstráltuk. A gerjesztéshez 455 nm hullámhosszúságú fényt, a detektáláshoz 520 nm-es felületeszűrő emissziós szűrőt használtunk. Az expozíciós idő 1.000 msec/kép volt 1 V feszültség érték mellett. A HEK293T-palmGFP eredetű mEV, sEV és a kontrollként PBS fluoreszcenciáját Eppendorf csövekben mértük. A fluoreszcens szkennelést megelőzően háttér képeket készítettünk fehér fénnel (400 nm – 800 nm), filter alkalmazása nélkül. Ebben az esetben az expozíciós idő 100 msec volt, 1 V feszültség érték mellett. Képanalízist VivoQuant szoftverrel (inviCRO, USA) végeztük.

16. Az EV felvétel vizsgálata áramlási citometriával

Az EV felvétel kinetikáját hepatocita-NPC ko-kultúrában határoztuk meg normolipémiás körülmények között. Egy μg lipid tartalmú, HEK293T-palmGFP eredetű mEV-t vagy sEV-t adva a ko-kultúrához megvizsgáltuk annak 2, 6 és 24 órát követően történő felvételét. A hiperlipidémia hatását a májsejtek EV felvételére PO kezelés segítségével vizsgáltuk. 16 óra FFA kezelést követően az mEV-eket és sEV-eket 24 órán keresztül inkubáltuk a sejtekkel. A sejtek EV felvételét áramlási citométerrel vizsgáltuk a következő protokoll szerint. A májsejteket tripszin és kollagenáz tartalmú steril tápoldattal (Accutase, Sigma, USA) szedték fel a tenyésztő lemez felszínéről. A hepatocitákat alacsony centrifugálási erővel választottuk el az NPC sejtektől (50 g, 3 perc, 4 °C), majd az EV-k felvételét a sejtek GFP szignálja alapján azonnal megvizsgáltuk. A hepatociták felülúszójából centrifugálással összegyűjtöttük az NPC-eket. A sejt üledéket FcR blokkoló reagenst (1:10, Miltényi Biotec, Németország) tartalmazó MACS pufferben (MACS BSA Stock oldatot 20-szorosra hígítottuk autoMACS Rinsing oldattal) reszuszpendáltuk. 10 perc inkubációt (4 °C) követően a nem kötődött FcR blokkolót centrifugálással eltávolítottuk, majd a sejteket 100 μl antitest tartalmú oldatban vettük fel. A következő antitesteket használtuk: monoklonális rekombináns humán anti-egér F4/80-PE (1:100, REA126), monoklonális patkány anti-egér CD146-PerCP-Vio700 (1:50, ME-9F1) (Miltényi Biotec, Németország). 15 perc 4 °C-on történő inkubációt követően a nem kötődött antitesteket centrifugálással eltávolítottuk, majd a sejt üledéket TO-PRO-3 életképességi festéket tartalmazó oldatban (1:3.000, ThermoFisher, USA) vettük fel és mértük CytoFLEX S áramlási citométerrel. A nyers adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük ki. A kapuzási stratégiánkat Lynch és munkatársainak munkája alapján határoztuk meg (**11. ábra**) [75].



11. ábra: A Kupffer sejtek és LSEC-k detektálása áramlási citométerrel. Az élő sejteken belül elkülönítettük a CD146⁺ (LSEC marker) és CD146⁻ eseményeket. Majd a CD146⁻ populáción belül azonosítottuk az F4/80⁺ (Kupffer sejt marker) sejteket.

17. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k radioizotópos jelölése és *in vivo* SPECT/CT követése

A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k radioizotópos jelölése ^{99m}Tc-HYNC-duramicin kittel történt (Molecular Targeting Technologies, USA) a Semmelweis Egyetem Nanobiotechnológiai és In Vivo Képző Központjában. Első lépésben a HYNIC-duramicin oligopeptidet ^{99m}Tc-vel jelöltük a gyártói utasítások szerint. 3,5 GBq [^{99m}TcO₄]⁻-t eluáltunk 0,5 ml sóoldatban és hozzáadtuk a kithoz, majd 80 °C-on 20 percig inkubáltuk. Ennél a lépésnél a radiokémiai hozamot fordított fázisú HPLC-vel ellenőriztük [29], ami 95 %-nál magasabbnak adódott. Ezt követően 60 µl mEV-hez/ sEV-hez (teljes lipid: 3 µg) 200 µl, 900 MBq ^{99m}Tc-HYNIC-duramicint adtunk hozzá és kihígítottuk 240 µl PBS-sel, majd 30 °C-on 20 percig inkubáltuk 200 rpm rázatás mellett. A jelölt EV-k tisztítása Sepharose CL-2B géllal töltött (V_T = 3,5 ml), SEC oszloppal történt. 0,5 ml EV mintát töltöttünk az oszlopra és 0,5 ml PBS frakciókat gyűjtöttünk. A radioaktív izotóp jelölt EV-eket 1-1,5 ml PBS oldatban gyűjtöttük össze. A radiokémiai tisztaságot Sepharose CL-2B-vel töltött Tricon 5/100 üveg oszloppal kombinált radio-HPLC-SEC-vel (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Svédország) ellenőriztük [76].

Az *in vivo* képalkotást NanoSPECT/CT Silver Upgrade szekvenciális kisállat SPECT/CT (Mediso Ltd., Magyarország) rendszerben végeztük. A SPECT/CT kísérletekben, C57BL/6 egerekbe, farok vénán keresztül 12 ± 3 MBq ^{99m}Tc -HYNC-duramicinnel jelölt sEV-t/ mEV-t injektáltunk. A mérést altatásban végeztük (1-1,5 %-os izoflurán), a szkennelés során az egerek testhőmérsékletének monitorozását, 37 °C-on tartását a NanoSPECT/CT készülék tette lehetővé. A CT és az azt követő SPECT mérés egy órával az injektálást követően történt. A rekonstruált képeket Fusion (Mediso Ltd., Magyarország) és VivoQuant szoftverekkel (inviCRO, USA) analizáltuk: a megfelelő vizsgálati régiókat (volume of interest, VOI) manuálisan a szervek fölé helyeztük a CT felvételen. A vizsgálati régiók radioaktivitását meghatároztuk és korrigáltuk a szórással és az izotóp bomlásával. Az EV-k eloszlását a szívben, tüdőben, vesékben, húgyhólyagban, májban, lépben és a csontokban is megmértük.

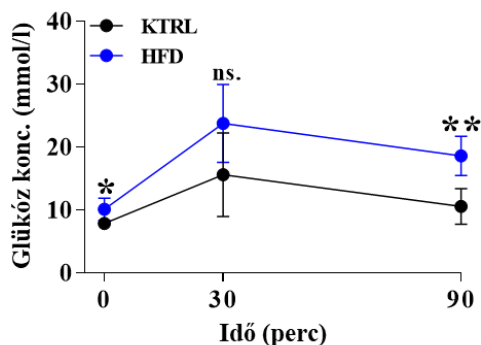
18. Statisztikai analízis és használt grafikai szoftverek

Az értékeket átlag $\pm$ SD (standard deviáció) értékben adtuk meg. A statisztikai analízist a GraphPad Prism 7,00 programban végeztük el. Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. A normál eloszlást mutató adatoknál, párosítatlan/páros T-tesztet, többszörös T-tesztet vagy két szempontos ANOVA tesztet végeztünk. Post-hoc analízisként a szignifikanciát Tukey's többszörös összehasonlító tesztjével határoztuk meg. Ha az adatok nem mutattak normális eloszlást Mann-Whitney tesztet választottunk. $p < 0,05$ alatt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak az eredményeket. A korreláció analízisnél Pearson-féle korrelációs együtthatót határoztunk meg (r , „two-tailed”). Abszolút értékeket tekintve a következő kategóriákat állítottuk fel: $r = 0-0,2$ = nincs korreláció, $r = 0,2-0,4$ = gyenge korreláció, $r = 0,4-0,6$ = mérsékelt korreláció, $r = 0,6-1$ = erős korreláció. Az ábrákat GraphPad Prism 7,00 és Microsoft PowerPoint programban készítettük el.

IV. Eredmények

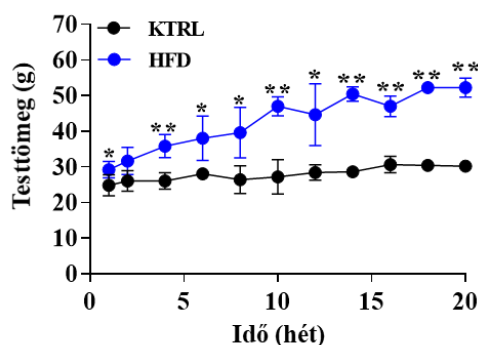
1. HFD vagy kontroll tápon tartott egerek karakterizálása

A szénhidrát anyagcsere állapotát jól tükrözi a vércukor terhelés vizsgálata. A HFD tápon tartott egerek éhomi vér glükóz szintje szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Továbbá a glükóz toleranciájuk csökkent: az intraperitoneális glükóz injekciót követően a vércukorszintjük magasabb maradt a kísérlet időtartama alatt (12. ábra).



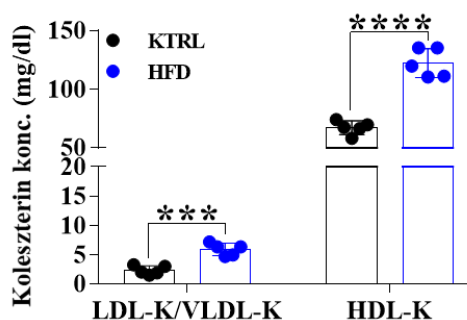
12. ábra: A HFD hatása az egerek éhomi és terheléses vér glükóz szintjére. A p értékek számolásánál párosítatlan T -tesztet használtunk. $n=5$. ns =nem szignifikáns, $*<0,05$, $**<0,01$

A magas zsírtartalmú étrend fokozza az elhízás kockázatát. Az egerek testtömege egy hét HFD diétát követően szignifikánsan megnőtt és a vizsgálat végéig emelkedett maradt a kontroll csoporthoz viszonyítva. (13. ábra).



13. ábra: A HFD hatása az egerek testtömegére. A p értékek számolásánál Mann-Whitney tesztet használtunk. $n = 5$. $*<0,05$, $**<0,01$

A magas koleszterinszint számos krónikus betegség pl. a nem-alkoholos zsírmáj rizikó faktora. A kontroll csoportokhoz viszonyítva a HFD megemelte a vérplazma LDL/VLDL és HDL koleszterin (K) szintjét (14. ábra).



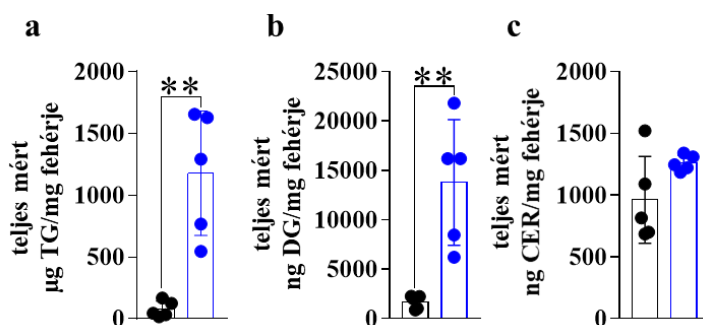
14. ábra: A HFD hatása a vérplazma koleszterinszintjére. A p értékek számolásánál párosítatlan T -tesztet használtunk. $n = 5$. $***<0,001$, $****<0,0001$

2. A máj lipid akkumulációjának vizsgálata

Az elhízás és a hiperlipidémia hatására a máj lipid terhelése és a nem-alkoholos zsírmáj kialakulásának valószínűsége nő. A vizsgált máj szövetminták legnagyobb koncentrációban TG-t

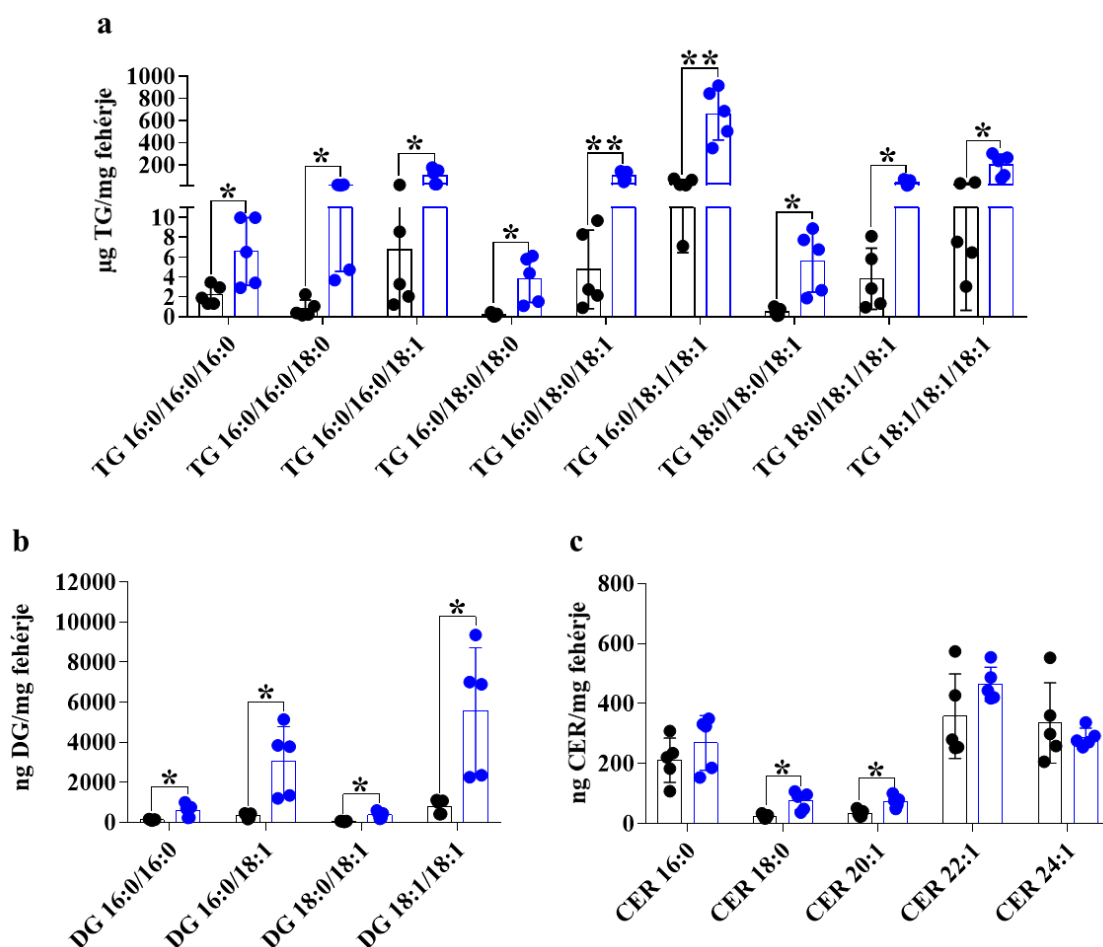
tartalmaztak, mennyiségben ezt követte a DG-ek és a ceramidok. A 20 hét HFD diétát követően szignifikánsan megnövekedett a TG-k (15/a

összemennyisége, azonban a ceramidok teljes koncentrációja nem változott meg (15/c ábra).



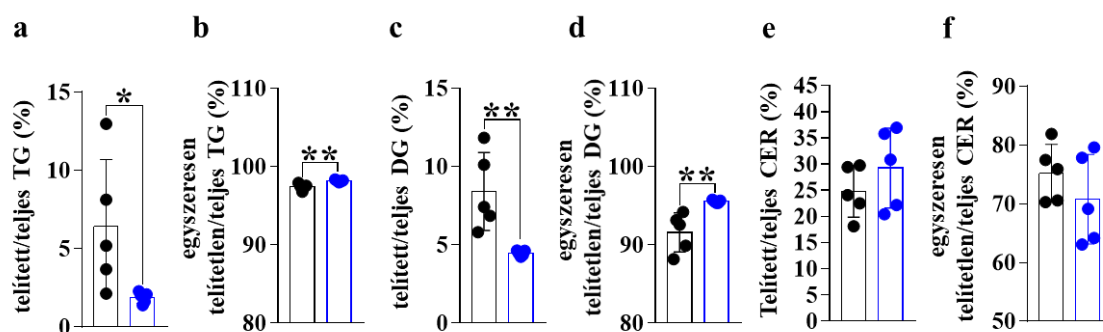
15. ábra: HFD hatása a detektált lipid típusok teljes koncentrációjára. A máj TG (a), DG (b) és CER (c) akkumulációja 20 hét HFD diétát követően. A p értéket párosítatlan T-tesztel határoztuk meg. n = 5. ***<0,01

A detektált lipid altípusok között az 1,2-dioleil-3-palmitoil-glicerin (TG 16:0/18:1/18:1), az 1,2,3-trioleil-glicerin (TG 18:1/18:1/18:1), az 1,2-dioleil-glicerin (DG 18:1/18:1), az 1-sztearil-2-oleil-glicerin (DG 16:0/18:1), az erukasav (CER 22:1) és a nervoniksav (CER 24:1) tartalmú ceramidok domináltak egyaránt a kontroll és a HFD csoportokban (16/a, 16/b és 16/c ábra). A HFD csoportban szignifikánsan nőtt az egyes TG és DG altípusok mennyisége (16/a és 16/c ábra). A ceramidokat tekintve a sztearinsav (CER 18:0) és arachinsav (CER 20:1) tartalmú altípusok szintje szignifikánsan megemelkedett (16/c ábra).



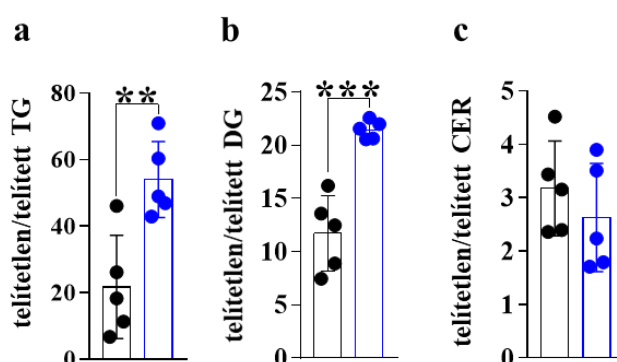
16. ábra: HFD hatása a detektált lipid altípusok koncentrációjára. A máj TG (a), DG (b) és CER (c) altípusainak akkumulációja 20 hét HFD diétát követően. A *p* értéket többszörös *T*-tesztel határoztuk meg. *n* = 5. **p* < 0,05, ***p* < 0,01

A telített lipid típusok lipotoxikusak lehetnek a telítetlen lipid típusokkal szemben. Megvizsgáltuk a kettős kötést nem tartalmazó telített és 1-3 kettős kötést tartalmazó (zsírsavanként maximum egy kettős kötés) egyszeresen telítetlen lipidek arányát a májban. A telített TG-k/DG-k aránya szignifikánsan csökkent, az egyszeresen telítetlen TG-k/DG-k aránya szignifikánsan megnövekedett (17/a, 17/b, 17/c és 17/d ábra). Ceramidokat tekintve ilyen tendenciát nem tapasztaltunk (17/e és 17/f ábra).



17. ábra: A telített és az egyszeresen telítetlen TG-k (a és b), DG-k (c és d) és CER-ok (e és f) aránya a teljes lipid mennyiséghez viszonyítva. A *p* értéket párosítatlan T-tesztel határoztuk meg. *n*=5, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001

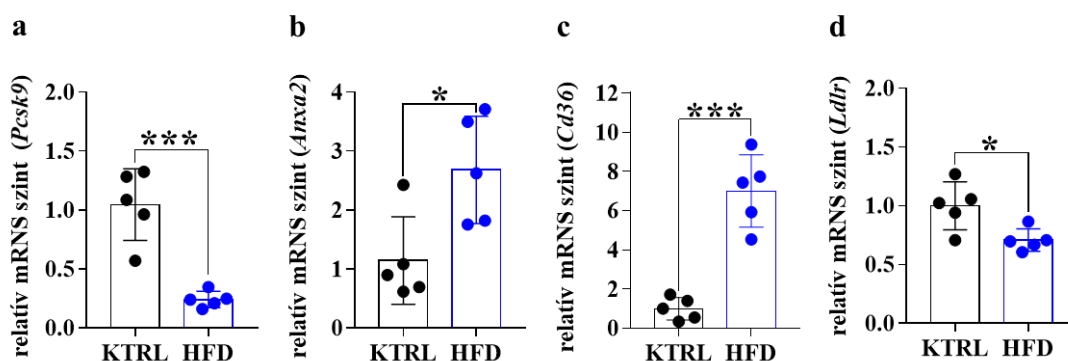
Az egyszeresen telítetlen és telített lipidek egymáshoz viszonyított aránya a TG-k és DG-k esetében szignifikánsan nőtt (18/a és 18/b ábra), a ceramidok tekintetében nem láttunk különbséget (18/c ábra).



18. ábra: Az egyszeresen telítetlen és a telített TG-k (a), DG-k (b) és ceramidok (c) egymáshoz viszonyított aránya. A *p* értéket párosítatlan T-tesztel határoztuk meg. *n*=5, ***p*<0,01, ****p*<0,001

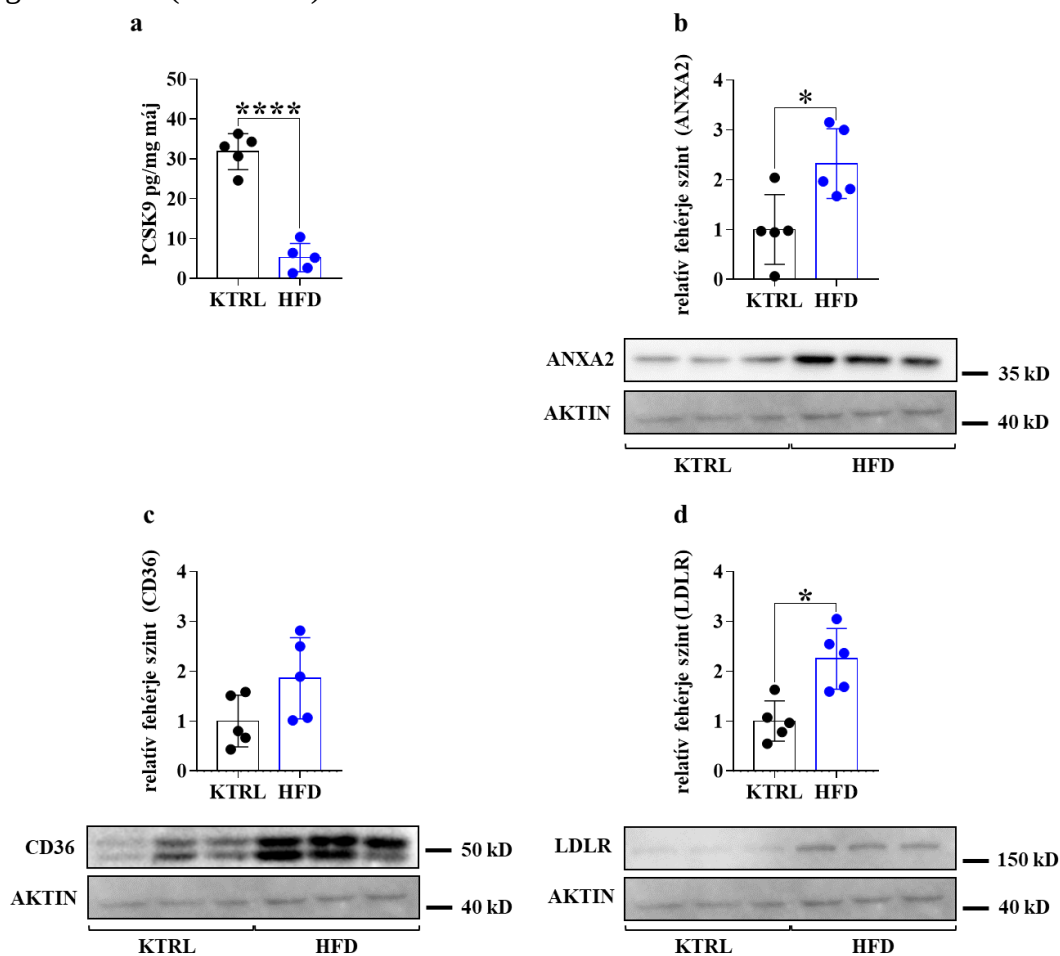
3. A máj PCSK9, LDLR, ANXA2 és CD36 expressziójának vizsgálata

A máj lipidfelvételében, a nem-alkoholos zsírmáj kialakulásában központi szerepet játszanak az LDLR és a CD36 receptorok. A PCSK9 fokozza az említett receptorok lebomlását, míg az ANXA2 endogén inhibitoroként a PCSK9 aktivitását csökkenti. A HFD hatására a *Pcsk9* mRNS expressziója szignifikánsan lecsökkent (19/a ábra). Az *Anxa2* szintje szignifikánsan megnőtt (19/b ábra). A *Cd36* mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedett (19/c ábra), míg az *Ldlr* szintje lecsökkent (19/d ábra).



19. ábra: A HFD hatása a máj *Pcsk9* (a), *Anxa2* (b), *Cd36* (c) és *Ldlr* (d) relatív mRNS expressziójára. A *p* értékeket párosítatlan *T* teszttel határoztuk meg. *n*=5, **p*<0,05, *****p*<0,001

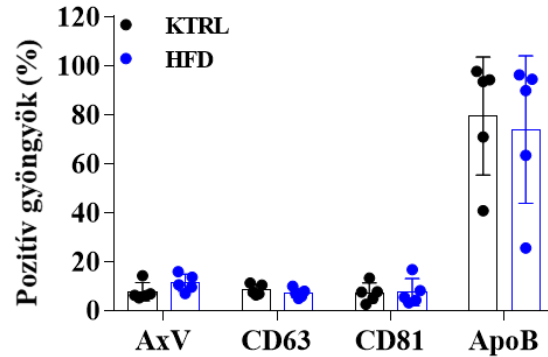
A HFD hatására a PCSK9 fehérje szintje szignifikánsan lecsökkent (20/a ábra). Az ANXA2 mennyisége szignifikánsan megemelkedett (20/b ábra). A CD36 esetében nem láttunk különbséget a csoportok között (20/c ábra). Az LDLR szintje szignifikánsan megemelkedett (20/d ábra).



20. ábra: A HFD hatása a máj PCSK9 (a), ANXA2 (b), CD36 (c) és LDLR (d) fehérje expressziójára. A *p* értékeket párosítatlan *T* teszttel határoztuk meg. *n*=5, **p*<0,05, *****p*<0,0001

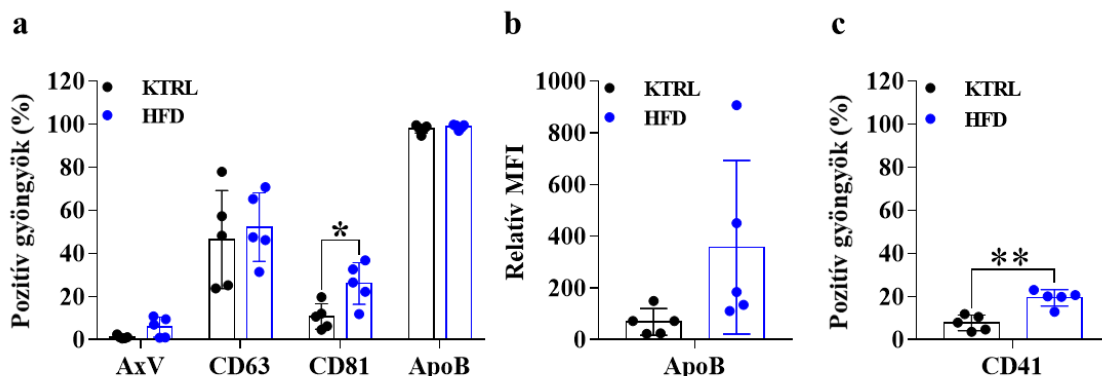
4. A hiperlipidémia hatása az egér vérplazma EV tartalmára

Hiperlipidémia hatására a plazma mEV koncentrációja nem változott meg (21. ábra). Az ApoB⁺, mEV-vel fedett gyöngyök százalékos aránya jóval magasabb volt az AxV, CD63 és CD81 markerekhez viszonyítva.



21. ábra: Keringő mEV-k jellemzése. A latex gyöngyhez kötött vérplazma eredetű mEV-eket AxV, CD63, CD81 és ApoB fehérje jelenléte alapján karakterizáltuk. $n=5$

A gyöngyhez kötött sEV-k eltérő mintázatot mutattak. Az AxV⁺ gyöngyök gyakorisága alacsony, míg a CD63⁺, CD81⁺ és ApoB⁺ gyöngyök aránya jóval magasabb volt az mEV-khez viszonyítva (22/a ábra). A CD81⁺ sEV-vel fedett gyöngyök aránya szignifikánsan megnövekedett a HFD csoportban. Az ApoB, az sEV-vel fedett gyöngyök 100 %-án jelen volt csoporttól függetlenül (22/a ábra). Ezzel szemben a relatív átlag fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékek alapján az ApoB jel magasabb volt a HFD csoportban (22/b ábra), amely jól korrelál a plazma LDL/VLDL koleszterin koncentrációjával. A vérplazmában a trombocita eredetű EV-k aránya magas (70-90 %). A vérlemezke eredetű EV-k részt vehetnek számos diszlipidémia asszociált betegség patogenezisében (pl. a nem-alkoholos zsírmáj, szteatohepatitisz, máj fibrózis és hepatocelluláris karcinóma) [77]. 20 hét HFD hatására szignifikánsan megnőtt a CD41⁺, sEV-vel fedett gyöngyök aránya (22/c ábra).



22. ábra: Keringő sEV-k jellemzése. A latex gyöngyhez kötött vérplazma eredetű sEV-eket AxV, CD63, CD81 (a), ApoB (a és b) és CD41 (c) fehérje jelenléte alapján karakterizáltuk. A p értékeket párosítatlan T teszttel határoztuk meg. $n=5$, * $<0,05$, ** $<0,01$

Az EV marker expresszióon kívül megvizsgáltuk az mEV-k/sEV-k méreteloszlását, partikulum koncentrációját és a fehérje/partikulum arányt (5. táblázat). Az említett paraméterekben nem találtunk szignifikáns eltérést.

5. táblázat: Keringő EV-k jellemzése méreteloszlás, partikulum koncentráció és fehérje/partikulum szám alapján.

	KTRL	HFD
	medián (X50)	
mEV	223,8 ± 39,5	201,9 ± 29,1
sEV	108,0 ± 25,6	162,2 ± 48,2
	partikulum / ml	
mEV	9,9x10 ⁷ ± 7,3x10 ⁷	1,1x10 ⁸ ± 3,6x10 ⁷
sEV	5,0x10 ⁹ ± 2,4x10 ⁹	1,1x10 ⁹ ± 2,6x10 ⁸
	fehérje / partikulum	
mEV	14,6 ± 24,4	8,7 ± 3,7
sEV	17,7 ± 10,6	1,3 ± 0,5

5. A plazma sEV és az egerek testtömege, plazma koleszterin és a máj lipid tartalma közötti korreláció vizsgálata

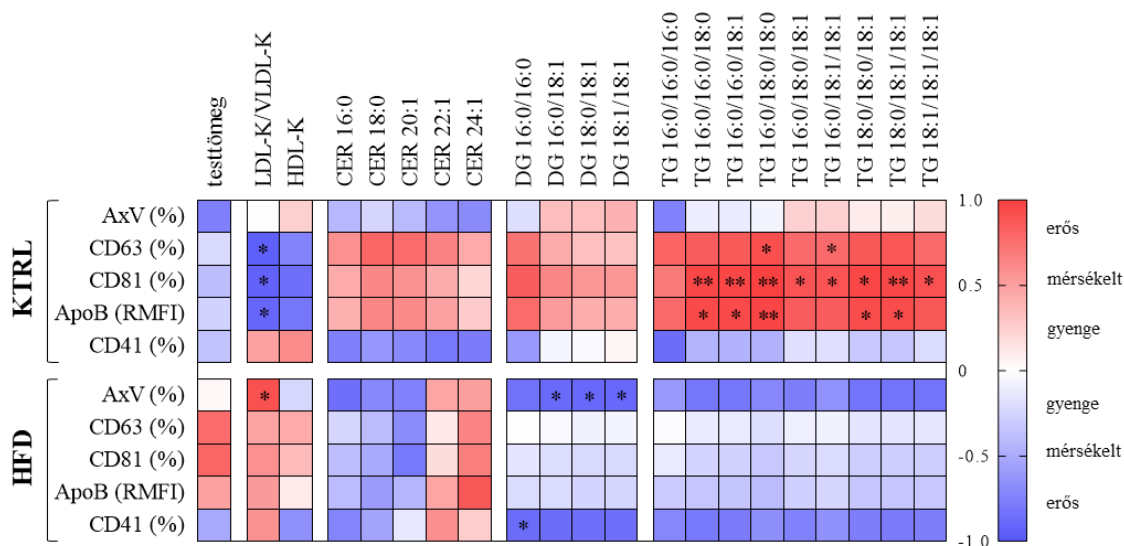
Az egerek testtömege, LDL-K/VLDL-K, HDL-K, máj lipid tartalom és a plazma sEV tartalma közötti összefüggést Pearson korrelációs együttható meghatározásával vizsgáltuk (23. ábra).

Az AxV⁺, kontroll plazma eredetű sEV-vel fedett gyöngyök erős negatív, a CD63⁺, CD81⁺, HFD plazma eredetű sEV-vel fedett gyöngyök erős pozitív korrelációt mutattak a testtömeghez viszonyítva.

A plazma koleszterin tartalmát tekintve a kontroll csoportban erős negatív (CD63⁺, CD81⁺, ApoB⁺ - LDL-K/VLDL-K, HDL-K), a HFD csoportban erős pozitív összefüggést találtunk (AxV⁺ - LDL-K/VLDL-K).

A kontroll egerek plazmájából szeparált, AxV⁺ sEV-vel fedett gyöngyök százalékos aránya gyenge korrelációt mutatott a vizsgált lipid típusokkal, kivételt képezett ez alól a CER 22:1, CER 24:1 és TG 16:0/16:0/16:0. A CD41⁺ gyöngyök aránya erős negatív összefüggést mutatott a ceramidokkal, a DG 16:0/16:0 és TG 16:0/16:0/16:0 altípusokkal. A CD63⁺, CD81⁺ és ApoB⁺ gyöngyök aránya pozitív korrelációt mutattak a vizsgált lipidekkel, legerősebb, szignifikáns kapcsolatot a TG-kkel mutattak. Ezzel szemben a HFD csoportban döntően negatív összefüggést láttunk. Az AxV erős negatív korrelációt mutatott a CER 16:0, CER 18:0, CER 20:1 ceramidokkal és az összes mért DG és TG altípusokkal. A CD41-nél szintén erős negatív összefüggést állapítottunk meg a CER16:0

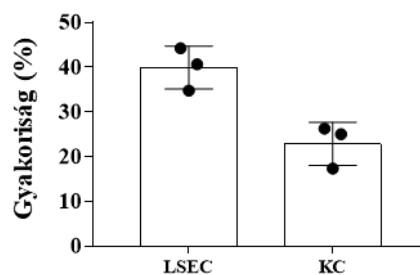
ceramiddal és az összes DG és TG altípussal. A CD63 és CD81 erős korrelációt mutatott a CER 20:1 és CER 24:1 altípusokkal. Az ApoB a CER 18:0 és CER 24:1 altípusokkal mutatott összefüggést.



23. ábra: A plazma sEV és az egerek testtömege, plazma koleszterin és a máj lipid tartalma közötti korreláció vizsgálata. $n=5$, $* < 0,05$, $** < 0,01$

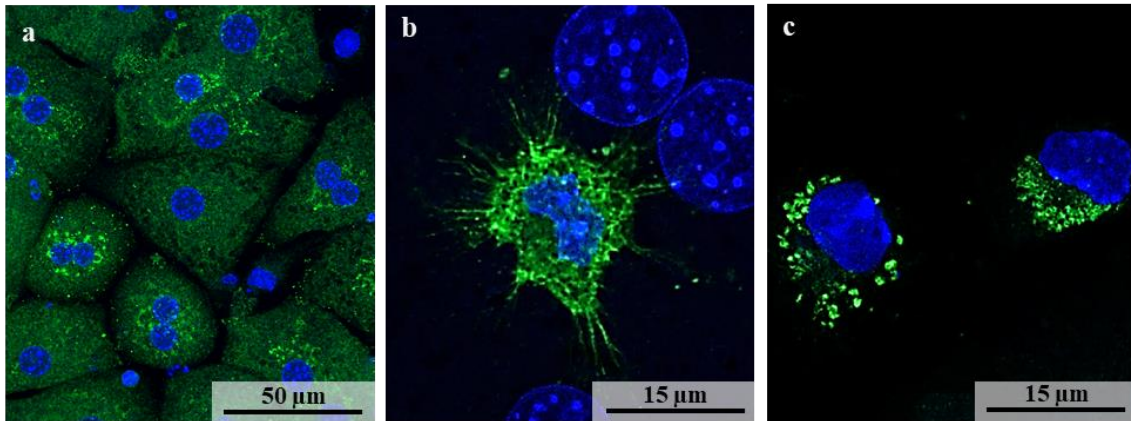
6. FFA kezelés hatása a májsejt kultúrákra

A frissen szeparált májsejtekből hepatocita monokultúrát és hepatocita-NPC ko-kultúrát hoztunk létre. A májsejt ko-kultúra hepatocita:LSEC:Kupffer sejt:egyéb sejteket tartalmazott 6:2:1:1 arányban, ami az egészséges, normál egér májra jellemző. A Kupffer sejtek és LSEC-k mennyiségét áramlási citométerrel validáltuk, ami megfelelt a fenti arálynak (Kupffer



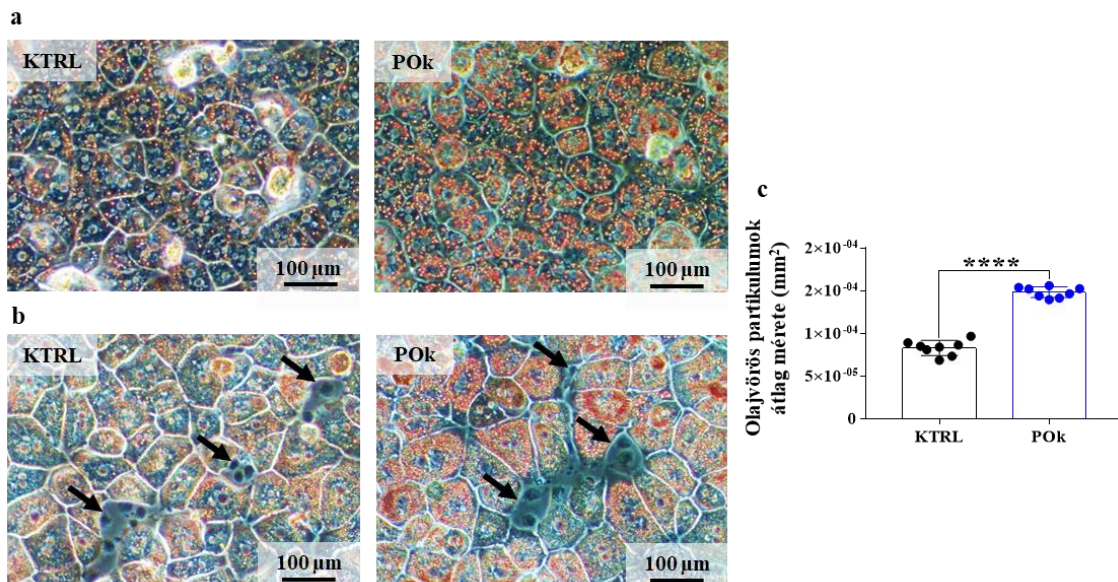
24. ábra: LSEC-k és KC-k aránya hepatocita-NPC ko-kultúrában.

$n=3$ sejt: 22,9 $\pm$ 4,8 %, LSEC: 39,9 $\pm$ 4,8 %) (24. ábra). A hepatociták (albumin⁺, 25/a ábra), a Kupffer sejtek (F4/80⁺, 25/b ábra) és az LSEC-k (CD146⁺, 25/c ábra) jelenlétét a ko-kultúrában immuncitokémiai módszerrel bizonyítottuk sejtípus specifikus markerek alapján.



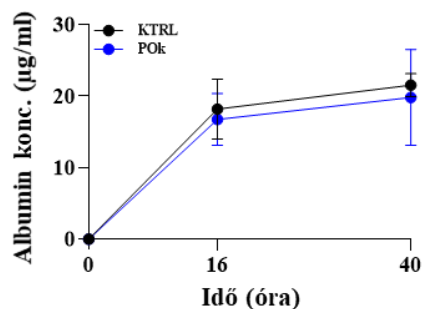
25. ábra: A hepatociták (albumin^+ , a), Kupffer sejtek (F4/80^+ , b) és az LSEC-k (CD146^+ , c) azonosítása a ko-kultúrában.

A hiperlipidémiás körülményeket OA és PA kezeléssel modelleztük. A hepatociták FBS mentes körülmények között kuboidális morfológiát mutattak (26/a és 26/b ábra). Citoplazmájukban lipid csepp akkumuláció volt látható olajvörös festés alapján. 16 óra FFA kezelést követően a lipid cseppek mérete szignifikánsan megnövekedett (26/c ábra). Ezzel szemben az NPC-k láthatóan nem halmoztak fel zsírcseppeket (26/b ábra, fekete nyilak).



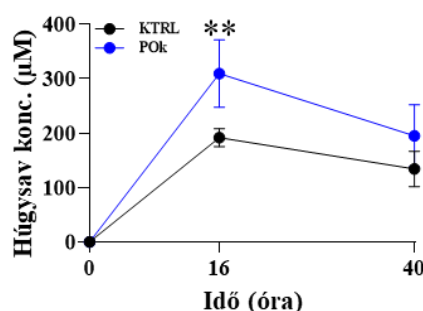
26. ábra: A hepatocita monokultúra (a) és a hepatocita-NPC ko-kultúra (b) TG akkumulációjának vizsgálata olajvörös festéssel. A hiperlipidémiás körülmények hatása a lipidcseppek méretére (c). A p értéket párosítatlan T -tesztel határoztuk meg. $n=8$, POk = palmitinsav és olajsav kezelt

Ismert, hogy a hepatociták specifikus sejtfunkciójukat elveszthetik és de-differenciálódhatnak *in vitro* körülmények között. A differenciált hepatociták egyik fontos funkciója az albumin termelés [72]. A kísérleti idő alatt a kontroll és az FFA kezelt hepatociták albumin termelésében nem láttunk különbséget (27. ábra).



27. ábra: A hepatociták albumin termelésének vizsgálata. $n=3$, POK = palmitinsav és olajsav kezelt

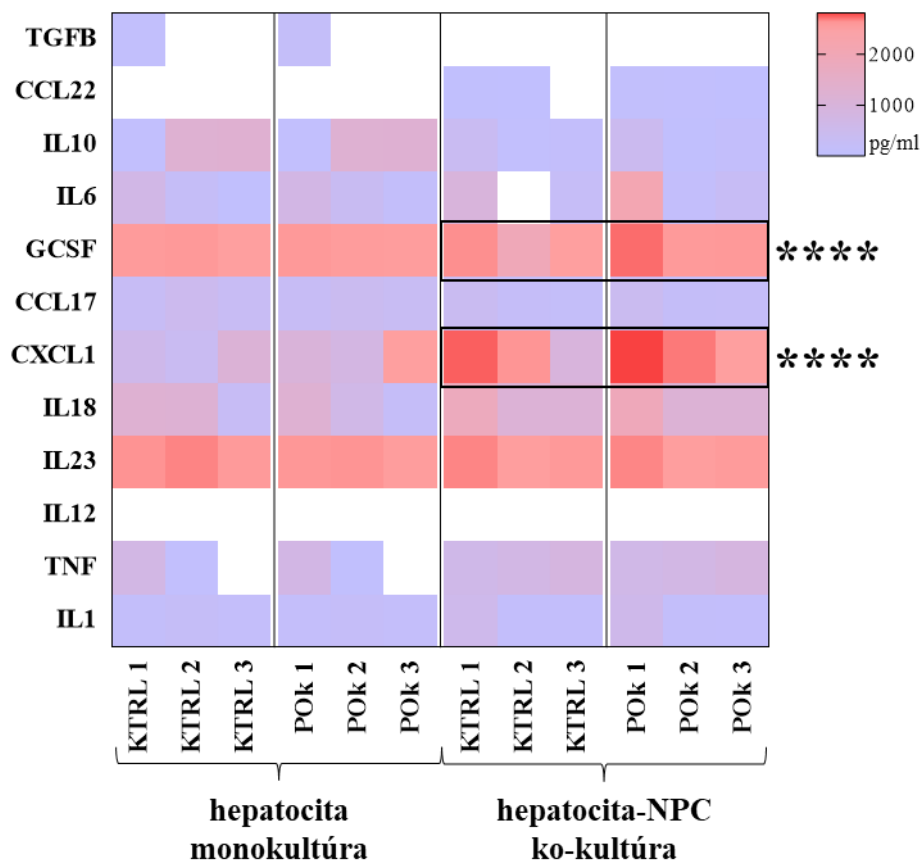
A hepatociták húgysav termelése jól korrelál a hiperlipidémiával és a zsírmáj kialakulásával. 16 óra FFA kezelést követően a hepatociták húgysav termelése szignifikánsan megnövekedett (28. ábra).



28. ábra: A hepatociták húgysav termelésének vizsgálata. A p értéket Tukey féle post-hoc teszttel kombinált két szempontos ANOVA-val határoztuk meg. $**<0,01$, $n=3$, POK = palmitinsav és olajsav kezelt

7. A májsejtek citokin termelésének vizsgálata

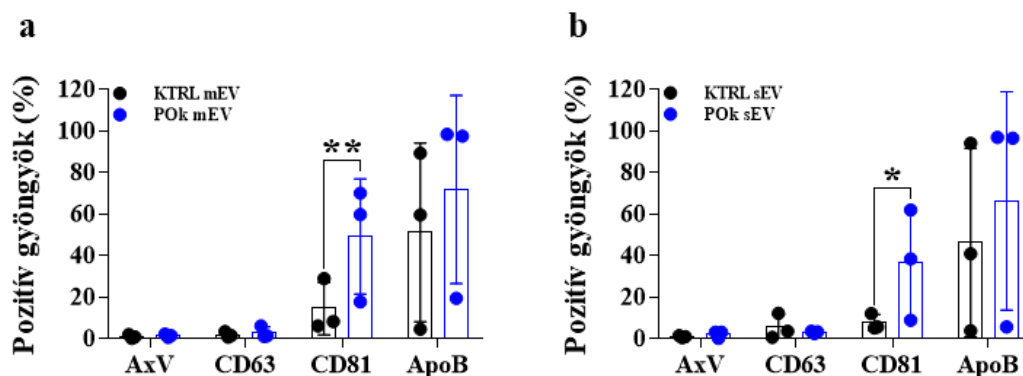
A májban nem csak a rezidens makrofágok (Kupffer sejtek) képesek citokin termelésre, hanem bizonyítottan egyéb sejtek is, mint például az LSEC-k és a hepatociták. A hepatociták nagy mennyiségben szekretálják a GCSF ($304,8 \pm 75,0$ pg/ml) és IL23 ($611,4 \pm 298,5$ pg/ml) fehérjét, expressziójukat a zsírsav kezelés nem befolyásolta (29. ábra). A hepatocita-NPC ko-kultúrában a GCSF ($336,3 \pm 272,6$ pg/ml) és az IL23 ($509,4 \pm 364,2$ pg/ml) fehérjéken kívül a CXCL1 ($830,3 \pm 981,6$ pg/ml) szintje is magasnak bizonyult. Az FFA kezelés szignifikánsan megnövelte a ko-kultúra kondicionált médiumának GCSF ($780,2 \pm 716,8$ pg/ml) és CXCL1 ($780,2 \pm 716,8$ pg/ml) citokin tartalmát (29. ábra).



29. ábra: A hiperlipidémiás körülmények hatása a májsejtek citokin termelésére. A hő térképen a 3-3 biológiai párhuzamos külön cellaként van feltüntetve. A p értékeket Tukey féle post-hoc teszttel kombinált két szempontos ANOVA-val határoztuk meg. $n = 3$, **** $<0,0001$, POk = palmitinsav és olajsav kezelt

8. A hiperlipidémia hatása a hepatociták EV termelésére

A hiperlipidémia hatását a hepatociták EV termelésére *in vitro* rendszerben vizsgáltuk. A plazma eredetű mintákhoz hasonlóan az EV-ket latex gyöngyhöz kötve áramlási citométerrel karakterizáltuk. Az EV marker expresszióin kívül a ko-izolált ApoB⁺ VLDL partikulumok és/vagy szolubilizált ApoB fehérje jelenlétét is detektáltuk. A hepatocita eredetű mEV-ket és sEV-ket kontroll és FFA kezelt sejtek szérumból, kondicionált médiumából szeparáltuk. Az AxV⁺ és CD63⁺ hepatocita eredetű mEV-vel vagy sEV-vel fedett gyöngyök aránya alacsony volt és az FFA kezelés nem befolyásolta mennyiségüket. Ezzel szemben, a hiperlipidémiás körülmények szignifikánsan megnövelték a CD81⁺ mEV-vel vagy sEV-vel fedett gyöngyök arányát (30/a és 30/b ábra).



30. ábra: A hepatocita eredetű mEV-k (a) és sEV-k (b) jellemzése. A latex gyöngyhez kötött hepatocita eredetű EV-eket AxV, CD63, CD81 és ApoB fehérje jelenléte alapján karakterizáltuk. A *p* értékeket Tukey féle post-hoc teszttel kombinált két szempontos ANOVA-val határoztuk meg. *n*=3, **p*<0,05, ***p*<0,01, POK = palmitinsav és olajsav kezelt

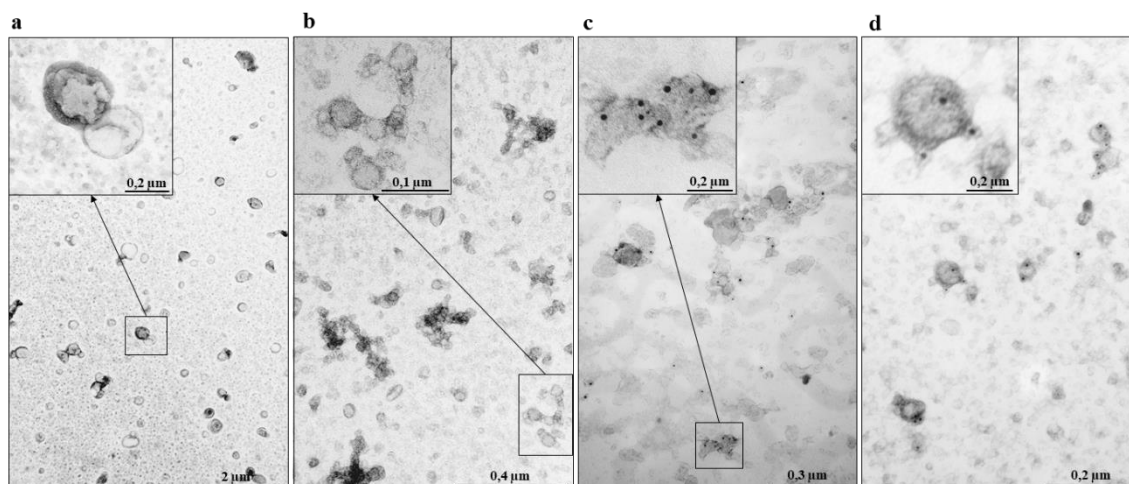
A marker expresszió kívül megvizsgáltuk a hepatocita eredetű mEV-k és sEV-k méreteloszlását, partikulum koncentrációját és a fehérje/partikulum arányát (6. táblázat). Az említett paraméterekben nem találtunk szignifikáns eltérést.

6. táblázat: A hepatocita eredetű EV-k jellemzése méreteloszlás, partikulum koncentráció és fehérje/partikulum szám alapján. POK = palmitinsav és olajsav kezelt

	KTRL	POK
	medián (X50)	
mEV	344,6 ± 26,5	319,9 ± 31,9
sEV	155,2 ± 4,6	150,9 ± 11,9
	partikulum / ml	
mEV	2,5x10 ⁸ ± 8,4x10 ⁷	1,5x10 ⁹ ± 1,0x10 ⁸
sEV	1,2x10 ⁹ ± 2,3x10 ⁸	6,4x10 ⁹ ± 1,9x10 ⁹
	fehérje / partikulum	
mEV	21,4 ± 8,9	9,0 ± 6,3
sEV	3,8 ± 1,0	2,4 ± 1,8

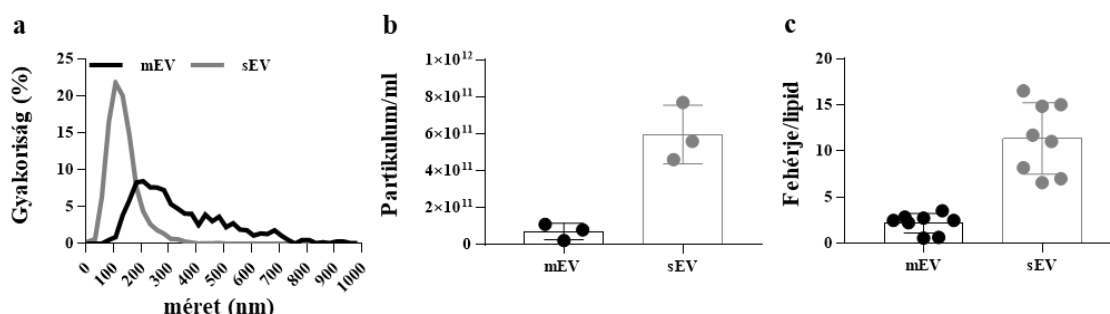
9. HEK293T-palmGFP eredetű EV-k *in vivo* eloszlása

A HEK293T-palmGFP eredetű mEV-eket és sEV-eket FBS mentes, kondicionált médiumból szeparáltuk. Az EV-k jelenlétét és morfológiáját negatív kontrasztosás mellett TEM-mel demonstráltuk (31/a és 31/b ábra), továbbá CD63 és CD81 EV markerek jelenlétét immun-TEM-mel vizsgáltuk (31/c és 31/d ábra).



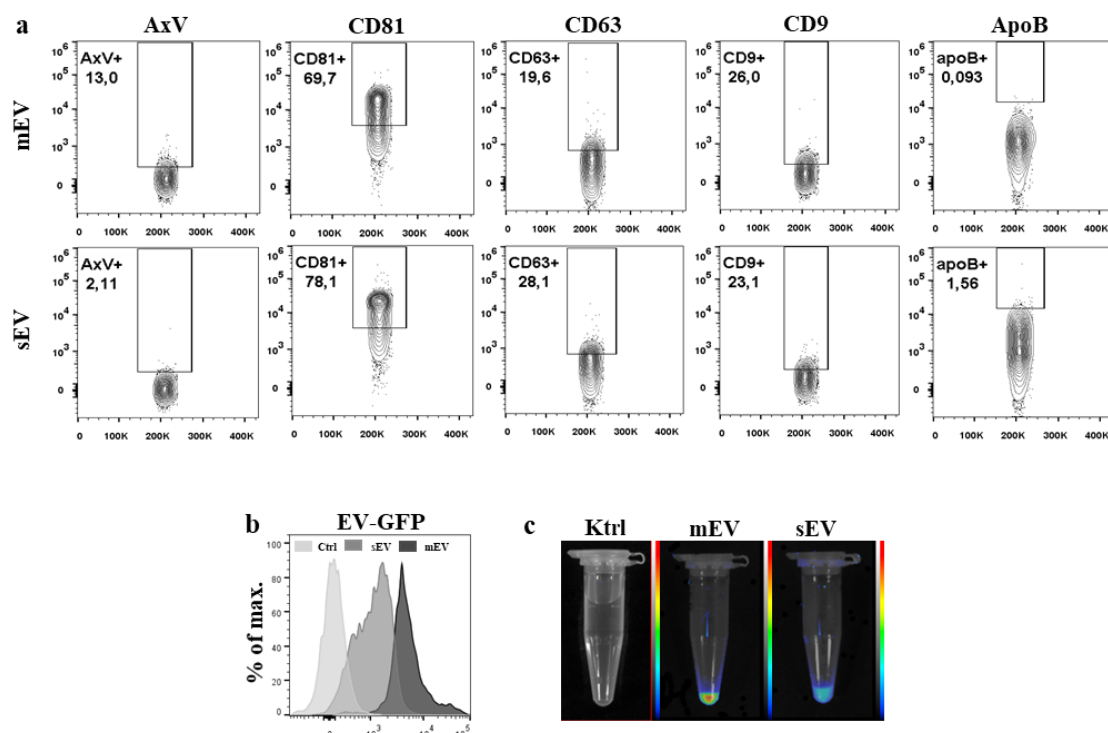
31. ábra: A HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k (a és c) és sEV-k (b és d) morfológiai vizsgálata TEM-mel. Az immun-TEM esetében (c és d) a kisebb (5 nm) arany kolloid a CD81, a nagyobb (10 nm) a CD63 markert jelöli.

Az NTA mérések alapján az mEV-k medián mérete $326,3 \pm 19,8$ nm és az sEV-k medián mérete $130,5 \pm 5,8$ nm-nek bizonyult (32/a ábra). Az mEV-k esetében a partikulum koncentráció $7,1 \times 10^{10} \pm 4,5 \times 10^{10}$ /ml, sEV-k esetében $6,0 \times 10^{11} \pm 1,6 \times 10^{11}$ /ml volt (32/b ábra). A fehérje/lipid arány mEV= $2,2 \pm 1,1$ és sEV= $11,4 \pm 3,9$ volt (32/c ábra).



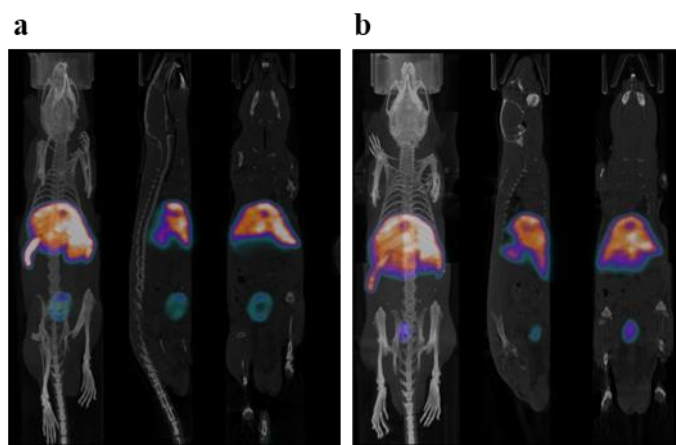
32. ábra: A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k méreteloszlása (a), partikulum koncentrációja (b, n=3) és fehérje/lipid aránya (c, n=8). mEV – fekete szimbólum, sEV – szürke szimbólum

Az EV markerek jelenlétét áramlási citométerrel vizsgáltuk. Alacsony CD63, CD9 arány mellett, kiemelkedő CD81 pozitivitást tapasztaltunk mindkét alpopuláció esetében (33/a ábra). Az EV-k GFP expresszióját áramlási citométerrel és FOBI módszerrel validáltuk (33/b és 33/c ábra).



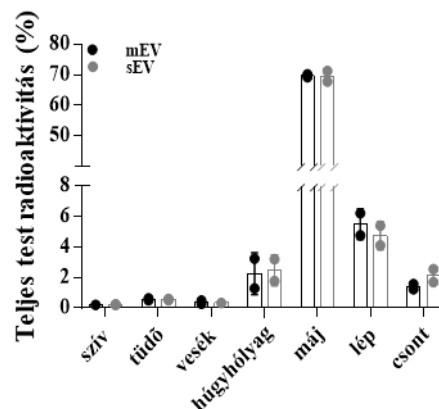
33. ábra: A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k jellemzése áramlási citométerrel (a és b) és FOBI készülékkel (c). (intenzitás értékek: min. 20 – max. 130), mEV – fekete szimbólum, sEV – szürke szimbólum

A ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin jelölt HEK293T-palmGFP eredetű EV-k radioaktivitása 60-80 MBq/3 μg (teljes lipid 0,5 ml-ben) volt. A jelölt EV-k tisztasága radio-HPLC-SEC mérés alapján magasabb volt, mint 95 %, ami alkalmas *in vivo* képalkotáshoz. Az intravénásan injektált mEV-k és sEV-k a májban és a lépben akkumulálódtak. A húgyhólyag területén is detektálható volt radioaktivitás (34. ábra), ami azonban az előkísérleteink szerint a szabad ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin kiválasztásából adódik.



34. ábra: HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k (a) és sEV-k (b) *in vivo* disztribúciója.

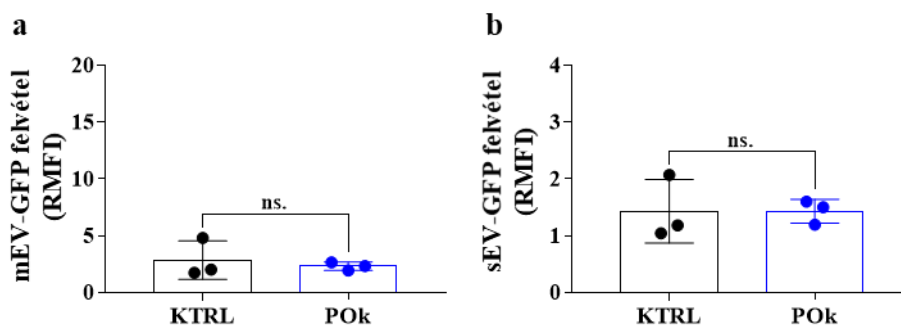
A sEV-k esetén a teljes radioaktivitás $69,5 \pm 2,5$ %-át, mEV-k esetén a $69,7 \pm 0,7$ %-át a máj területén detektáltuk. A lép bizonyult a második legjelentősebb szervnek az EV-k akkumulációjában (sEV: $4,8 \pm 1,0$ %, mEV: $5,5 \pm 1,0$ %) (35. ábra).



35. ábra: HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k és sEV-k disztribúciójának kvantifikálása. $n=2$

10. EV felvétel hepatocita monokultúrában normo- és hiperlipémiás környezetben

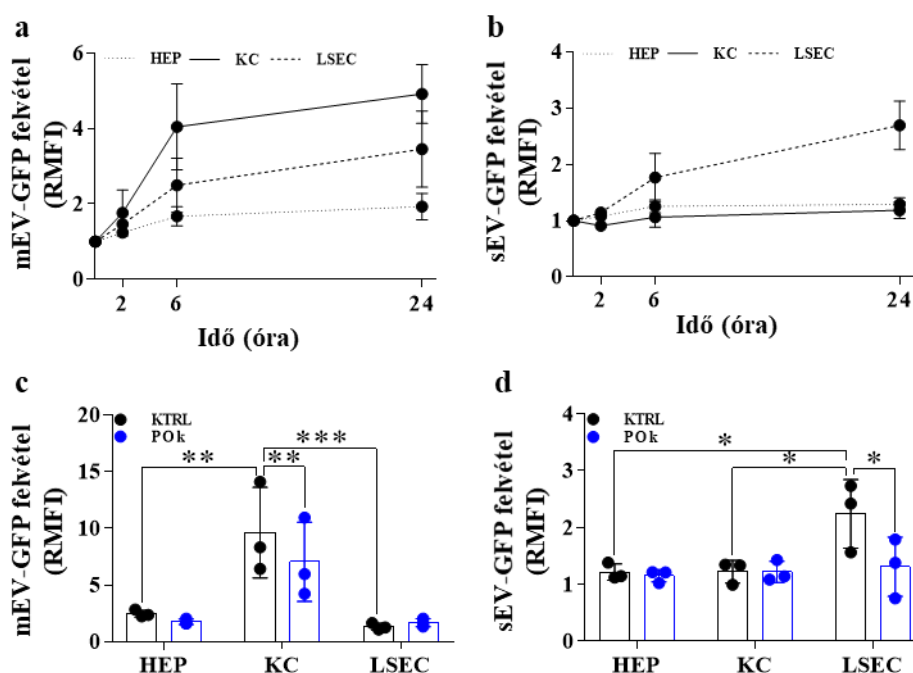
Az *in vivo* disztribúciós eredmények alapján felmerült a kérdés, hogy vajon a hepatociták milyen mértékben képesek az EV-eket felvenni és eliminálni. A kérdések megválaszolására HEK293T-palmGFP eredetű EV-k felvételét vizsgáltuk hepatocita monokultúrában. A kinetikai vizsgálat szerint a felvételi maximumot 24 óra után éri el. A 36/a és 36/b ábrán $1 \mu\text{g}$ lipid tartalomra normalizált EV felvételét látjuk hepatocita monokultúrában 24 óra inkubációt követően, szérumentes körülmények között. A hiperlipidémiás körülmények nem befolyásolták a sejtek EV felvételét.



36. ábra: Az mEV-k (a) és sEV-k (b) felvételének vizsgálata hepatocita monokultúrában normo- és hiperlipidémiás körülmények között. A p értékeket párosított T -tesztel határoztuk meg. $n=3$, ns = nem szignifikáns, RMFI: relatív átlag fluoreszcencia intenzitás, POK = palmitinsav és olajsav kezelt

11. EV felvétel hepatocita-NPC ko-kultúrában normo- és hiperlipémiás környezetben

Az LSEC és Kupffer sejteknek kiemelkedő szerepe van a makromolekulák, különböző partikulumok vérkeringésből történő eltávolításában. Azért, hogy teljesebb képet kapjunk a máj nanopartikulum eltávolító képességéről az EV-k felvételét hepatocita-NPC ko-kultúrában is megfigyeltük. A kinetikai vizsgálat szerint a májsejtek a felvételi maximumot 24 óra után érik el. (37/a és 37/b ábra). A Kupffer sejtek inkább az mEV-eket vették fel, míg az LSEC-k szerepe az sEV felvételben volt kiemelkedő. Hiperlipidémiás körülmények között a májsejtek lipid akkumulációja megemelkedett. Előkísérleteink alapján, korábbi időpontokban a hiperlipidémiás körülmények nem befolyásolták az EV-k felvételét. Ezzel ellentétben, 24 óra inkubációt követően a hiperlipidémia szignifikánsan lecsökkentette a Kupffer sejtek mEV és az LSEC-k sEV felvételét (37/c és 37/d ábra).



37. ábra: EV felvétel vizsgálata hepatocita-NPC ko-kultúrában. A hepatocita-NPC ko-kultúrában az EV felvétel kinetikai vizsgálata alapján (a és b) 24 óra inkubációt követően vizsgáltuk a hiperlipidémia hatását a májsejtek mEV (c) és sEV (d) felvételére. A *p* értékeket Tukey féle post-hoc teszttel kombinált két szempontos ANOVA-val határoztuk meg (c és d). *n*=3, **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, RMFI: relatív átlag fluoreszcencia intenzitás, POk = palmitinsav és olajsav kezelt

V. Megbeszélés

A hiperlipidémia hatására kialakuló kórképeket (pl. a kardiovaszkuláris elváltozások és a nem-alkoholos zsírmáj) a vezető halálokok között tartják számon világszerte. Az EV-k szerepe az említett betegségek patomechanizmusában egyre jobban előtérbe kerül. Speciális molekuláris összetételük miatt diagnosztikus biomarkerek lehetnek, de terápiás céllal gyógyszer szállító partikulumként is hasznosíthatók. A keringő EV-k mennyisége/minősége befolyásolhatja a gyógyszerek vezikuláris úton történő célba juttatását. Munkánk célja a máj lipidfelhalmozásának, az EV szekréció és felvétel dinamikájának megértése volt normolipémia és hiperlipidémia során.

A hiperlipidémia magas vérzsírszinttel jellemezhető kórkép, amely megemelkedett TG, koleszterin-észter és plazma lipoprotein szinttel járhat [78]. Vizsgálatainkban az egereket 20 hétig HFD tápon tartottuk, a hiperlipidémia kialakulását LDL/VLDL és HDL koleszterin mérésével ellenőriztük. A nyugati típusú, HFD étrend során fokozódik a táplálékból származó zsírsavak felvétele a vékonybélben. Később a kilomikronba csomagolt zsírsavak felszabadulhatnak és albuminhoz kötődve eljuthatnak a májhoz [33]. A HFD inzulin rezisztenciát is okozhat, amely tovább növeli a plazma FFA szintjét [79]. A vér megnövekedett FFA tartalma a máj fokozott zsírsav felvételével és raktározásával társul, melynek következtében a nem-alkoholos zsírmáj kialakulásának valószínűsége nő.

A máj lipid összetétele klinikopatológiai jelentőséggel bír. A zsírmáj jellegzetes TG mintázatot mutat. Alarmi és munkatársai humán zsírmáj vizsgálatokban a 48:0, 50:0, 50:1, 50:2, 54:2 és 54:3 TG típusok felhalmozódását írták le [80], amit a mi eredményeink is alátámasztanak. Az intenzív DG akkumuláció viszont rosszabb prognózist jelent az előbbinél, és hozzájárul a máj inzulin rezisztencia kialakulásához [81,82]. A 20 hét HFD szignifikánsan megemelte a 32:0, 34:1, 36:1 és 36:2 DG típusok mennyiségét. A palmitát kezelt májdaganatból származó sejtek, hasonló tendenciát, a 32:0 és 34:1 DG típusok emelkedését mutatták [83]. A ceramidok szintén hozzájárulhatnak a májbetegségek kialakulásához. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a magas telített zsír és koleszterin tartalmú (42 % és 1,5 %) étrend fokozza a májban raktározott ceramidok mennyiségét [84]. Az LDLR gén kiütését követően a pro-apoptotikus, pro-inflammatórikus ceramidok (16:0, 18:0) mennyisége megemelkedik [85]. Továbbá az NAFLD előrehaladott (nem-alkoholos szteatohepatitisz) fázisában jellemző a ceramid anyagcserének zavara [86]. Az

irodalmi adatokkal összhangban vizsgálataink során a 20 hét HFD étrend megemelte a 21:1 és 18:0 ceramidok mennyiségét.

Az alkalmazott krónikus HFD bár megnövelte a máj lipidfelhalmozását, a lipotoxikus körülményekre jellemző, gyulladásos (*Il6*, *Tnf*) és fibrotikus (*Col4a1*, *Tgfβ*) elváltozásra utaló gének expressziója nem változott jelentősen a kontroll csoporthoz viszonyítva (nem bemutatott adatok). Összefoglalva, az alkalmazott magas OA/PA aránnyal jellemezhető HFD táp fokozta a máj lipid akkumulációját, a lipotoxicitásra jellemző hatás alacsony mértékű volt. Eredményeink az irodalmi adatokkal összeegyeztethetők: a táp magas zsírtartalma egyszerű zsírmájhoz vezet. Amennyiben növeljük a táp koleszterin tartalmát és/vagy az állatoknak fruktózzal/glükózzal/szukrózzal kiegészített vizet biztosítunk nagyobb valószínűséggel alakul ki gyulladás és fibrózis [87].

Kísérleteink alapján elmondható, hogy a 20 hetes HFD a máj lipid anyagcseréjében fontos szerepet játszó LDLR, CD36 és szabályozófehérjéknek a PCSK9 és ANXA2 szintjét is befolyásolja. Az LDLR mennyiségére számos tényező hat, szintje korrelál a plazma lipid és lipoprotein tartalmával [88–90]. Az LDLR mRNS mennyiségét többek között befolyásolhatja a táp telítetlen/telített lipid tartalma [91]. Vizsgálatainkban a 20 hetes HFD étrend megnövelte a máj LDLR fehérje szintjét. Jelenlegi ismereteink szerint a magas CD36 expresszió megemelkedett FFA felvétellel és fokozott TG akkumulációval társul [92]. Ennek alapján a CD36 központi szerepet játszik az NAFLD patomechanizmusában. A CD36 más metabolikus kórképekhez is köthető, például: inzulin rezisztencia, elhízás, II-es típusú diabetes [92]. Habár a 20 hét HFD nem emelte meg szignifikánsan a CD36 fehérje szintjét, egy enyhe pozitív trend látható.

A PCSK9 az LDLR és CD36 fehérjékhez kötődve fokozza sejtbe történő visszavételüket és lizoszómális lebontásukat [38,45]. Az elmúlt években számos betegségben felismerték jelentőségét, például az inzulin rezisztenciában és az ateroszklerózisban. Emellett a máj lipidfelhalmozásához, a szteatózis kialakulásához is hozzájárulhat [93]. Az ANXA2 a PCSK9 természetes inhibitora [94]. ANXA2 génkiütött egerekben a plazma PCSK9 koncentrációja nőtt, ezzel párhuzamosan az LDLR expresszió csökkent. Ezen folyamatok a plazma LDL tartalmának és az ateroszklerózis rizikójának emelkedéséhez vezetett [95]. A humán ANXA2 egyes genetikai variánsai (rs11633032 és rs17191344) hasonló változásokat mutatnak, mint ami a génkiütött egerekben megfigyelhető [96]. Az ANXA2 a máj lipidtartalmának szabályozásában is

részt vesz, a szteatózis egyik fontos markere. Kísérleteinkben a máj PCSK9 mRNS és fehérje tartalma szignifikánsan csökkent, az ANXA2 expressziója szignifikánsan nőtt. Ezen folyamatok szintén hozzájárultak az LDLR és CD36 mennyiségének növekedéséhez, a máj fokozott lipidfelhalmozásához.

In vitro a gyakran használt PO kezelést választottuk a hiperlipidémiás körülmények modellezésére [97,98]. A sejt kultúrák rendszerünkben ugyanazok a zsírsavak (OA és PA) domináltak, mint az alkalmazott HFD tápban. Az *in vivo* eredményeinkhez hasonlóan a hepatociták TG akkumulációja megnövekedett FFA kezelést követően. A májnak számos feladata közül szerepe van az immunitásban is [99]. A parenchimális, nem-parenchimális és az infiltrálódó immunsejtek is képesek citokin termelésükkel befolyásolni a máj működését. A hepatocita-NPC ko-kultúrában a hiperlipidémiás körülmények megnövelték a GCSF és CXCL1 citokinek szintjét. A GCSF szerepe a zsírmáj patogenezisében nem egyértelmű. A SREBP-1c transzkripció faktor gátlásán keresztül csökkentheti a hepatociták lipogenezisét, TG akkumulációját [100]. Ezzel szemben, hozzájárulhat az FFA indukált inzulin rezisztenciához, az endotél sejtek aktiválva angiogenezishez és fibrotikus progresszióhoz [101,102]. Továbbá fokozhatja a vörös csontvelőben a neutrofil granulociták termelését. Az NAFLD betegeknél jellemzően magas a máj CXCL1 expressziója [103]. A CXCL1 kemokin gradiens mentén a neutrofilek eljuthatnak a májba. Ezen sejtek a reaktív oxigén származékok, proteázok és gyulladásos mediátorok termelésével előidézhetik a hepatociták sérülését (ballonsejtek kialakulását), gyulladásos és fibrotikus folyamatokat indukálhatnak. Ismert tény, hogy az egér máj kevésbé hatékony a neutrofilek toborzásában [104]. Ez részben magyarázatot ad arra, hogy a HFD tápon tartott egerek esetében miért csak enyhe zsírmáj alakulhatott ki.

A hiperlipidémia hatását a vérplazma és a hepatociták EV termelésére előttünk más kutatócsoportok is vizsgálták [64,65,105–108]. Azonban rövidebb idejű HFD étrendet alkalmaztak, csak az sEV-kre koncentráltak és döntően differenciál centrifugálással szeparálták az EV-ket. A korábbi vizsgálatokat alátámasztva megállapítottuk, hogy a HFD megnöveli a keringő EV-k mennyiségét. Eredményeink megegyeznek a nemzetközi irodalmi adatokkal: ahogy nő az egerek testtömege és a plazma koleszterin tartalma, úgy emelkedik a plazma EV tartalma is [109]. Szekunder hiperlipidémiára nem csak az emelkedett plazma EV mennyiség jellemző, hanem emelkedett hepatocita EV termelés is. Az EV markereken kívül megvizsgáltuk az EV-vel fedett latex gyöngyök ApoB

pozitivitását is. A keringő és hepatocita eredetű mEV-knél és sEV-knél is sikerült detektálni az ApoB fehérjét a gyöngyök felszínén. A hepatocita eredetű EV minták esetében a hiperlipidémiás körülmények nem befolyásolták az ApoB jelenlétét. A HFD hatására a latex gyöngyök MFI értéke alapján az ApoB mennyisége nőtt, amely jól korrelál a plazma LDL/VLDL tartalmával. Irodalmi adatok alapján az ApoB fehérje jelenlétének az EV mintákban számos oka lehet. A vérplazma nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben tartalmaz lipoproteineket (10^{16}), mint EV-ket (10^9), fizikai tulajdonságaiknak átfedése miatt a szeparált EV-k lipoprotein szennyezettsége magas. A lipoproteinek közül a kilomikronok, LDL és VLDL partikulumok hordoznak a felszínükön ApoB fehérjét. A kilomikron szennyeződés csökkentése érdekében minden esetben táplálékmegvonást követően gyűjtöttünk vérmintákat [47]. A potenciális LDL/VLDL partikulumok ko-izoláció mellett, az ApoB pozitivitás az EV-lipoprotein aggregátumokból is adódhat [47]. Tóth és munkatársai kimutatták, hogy az EV-k köré egy fehérjeréteg (fehérje korona) szerveződik, amely többek között ApoB fehérjét is tartalmaz. Ez azt bizonyítja, hogy az ApoB nem csupán egy ko-izolált szennyeződés, hanem természetes alkotó eleme is lehet az EV-k fehérje koronának [49].

Kísérleteink során a kontroll egér csoportnál a plazma $CD63^+$, $CD81^+$ és $ApoB^+$ sEV-vel fedett gyöngyök aránya erős pozitív korrelációt mutatott a máj TG tartalmával. Ezzel szemben a HFD egerek esetében az AxV^+ és $CD41^+$ sEV-vel fedett gyöngyök negatív korrelációt mutattak a máj DG (kisebb mértékben a TG) tartalmával. A leírt ellentétes összefüggés mögött számos folyamat állhat. Az EV-k befolyásolhatják a sejtek lipid felhalmozását, illetve a sejtek lipid összetétele is meghatározza a szekretált EV-k összetételét és mennyiségét [110]. Az EV-k, mint szállító részecskék részt vehetnek a lipidek, pl. a koleszterin, szabad zsírsavak direkt transzferében [110]. Emellett a lipid anyagcserében résztvevő szabályozó molekulák, enzimek EV-kbe csomagolódhatnak. Például az EV asszociált miR-122 fokozza a máj zsírsav és koleszterin szintézisét [111].

Bár az EV alapú terápiás rendszerek egyre nagyobb figyelmet kapnak, a máj gyors EV felvétele a vérkeringésből limitálja felhasználhatóságukat. Ezen okoknál fogva az egyetlen terápiás célpont ahol alkalmazható, az maga a máj. Emellett, számos fejlesztés folyik az EV lokális terápiás felhasználhatóságát illetően [112–114]. Ha jobban megérténénk az egyes májsejt típusok szerepét az EV-k felvételében, lehetővé válna specifikusabb EV alapú terápia kifejlesztése. Mivel a hiperlipidémia súlyos egészségügyi

probléma a fejlett országokban, érdemes tovább vizsgálni a vérzsírszint és a keringő EV közötti kapcsolatot. Az EV-markerek meghatározásakor nem csupán az aktuális étkezési státuszt (éhomiai vagy étkezés utáni) kéne figyelembe venni, hanem a táplálék átlagos zsírtartalmát is. Az emelkedett EV szint nem csupán diagnosztikai jelentőséggel bír, hanem patológiás folyamatokban is részt vehet (pl. fokozhatja a vérrögök kialakulását).

Az EV-k eloszlásának vizsgálata kulcsfontosságú az EV alapú terápiák kifejlesztésénél. A nem-invazív módszerek korlátozott módon képesek az EV-k disztribúcióját követni. A gyakran használt optikai képalkotó eljárások hatékonyságát a fluoreszcens és biolumineszcens szignálok alacsony penetrációja és a kvantifikáció hiánya limitálja. A radioaktív izotóppal jelölt EV-k SPECT és PET eljárással történő detektálása még mindig gyerekcipőben jár [27,115–119]. A duramicin egy PE kötő peptid, amely alkalmas lehet az EV-k ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin radioaktív jelölésére. Az EV-k felszínükön nagy mennyiségű PE-t hordoznak, hiszen a PE és PS externalizációja egy kulcsfontosságú lépés az EV-k szintéziséhez. A duramicin egy 19 aminosavból álló tetraciklusos, alacsony molekula tömegű, stabil szerkezetű, magas kötési affinitású peptid [29]. Munkánk során nagy hatékonysággal és stabilitással tudtunk ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin jelölt EV-ket létrehozni. *In vivo* eredményeink alapján a ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin jelölt HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k és sEV-k eloszlása hasonló volt a korábban vizsgált ^{99m}Tc -trikarbonil jelölt eritrocita eredetű EV-hez [27].

A máj a szervezet természetes scavenger-ének tekinthető az EV-k eredetétől függetlenül. Wiklander és munkatársai az eltérő származású EV-k eloszlását vizsgálták egérben [120]. A C1C12 egér sejtvonal felülúszójából szeparált EV-khez viszonyítva a humán (HEK293T) és patkány (OLN-93) eredetű EV-k azonos eloszlást mutattak. Az EV-k vérkeringésből történő eliminációjában leggyakrabban a veleszületett immunrendszer fagocita sejtjei vesznek részt. A klodronát liposzómával makrofág depletált egerekben a B16BL6 eredetű EV-k a kontrollhoz viszonyítva ugyanúgy a májban gyűltek össze [121]. Ennek alapján valószínű, hogy nemcsak a makrofágok vesznek részt az EV-k eliminációjában. Az *in vitro* hepatocita-NPC kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a máj rezidens makrofágok mellett (Kupffer sejtek) a hepatociták és az LSEC-k is képesek az EV-k felvételére. A Kupffer sejtek a nagyobb méretű (≥ 100 nm) oldhatatlan partikulumokat fagocitózissal, míg az LSEC-k a kisebb (≤ 100 nm) partikulumokat pinocitózissal távolítják el [122,123], amit alátámaszt az is, hogy

sejtkultúrás rendszerünkben az mEV-eket a Kupffer sejtek, az sEV-eket az LSEC-k vették fel hatékonyabban. Ismert tény, hogy a diszlipidémiás körülmények megváltoztathatják a sejtek nanopartikulum felvételét. Asanuma és munkatársai SPIO-MRI technológiával bizonyították, hogy nem-alkoholos zsírmáj betegségben csökken a Kupffer sejtek fagocitotikus kapacitása [124]. Azonban az LSEC-k felvételi kapacitásának változását eddig nem sikerült bizonyítani. Kísérleteink során a hiperlipidémiás körülmények szignifikánsan lecsökkentették egyaránt a Kupffer sejtek és az LSEC-k mEV/sEV felvételét.

VI. Következtetések

A máj központi szerepet játszik az EV-k eliminációjában, de ezen vezikulák szabályozó funkcióval is rendelkeznek. Hiperlipidémiás körülmények között fokozódik a lipidek felhalmozása a hepatocitákban, ami zsírmáj kialakulásához vezethet. Munkánk során a máj lipidfelhalmozódását és az EV dinamika változásait vizsgáltuk normolipémiás és hiperlipidémiás körülmények között.

Vizsgálatainkban a következőket bizonyítottuk:

- A 20 hétig tartó krónikus magas zsírtartalmú diéta (HFD) elhízással társuló anyagcsere változásokat okoz egerekben. A plazma éhomi koleszterin (LDL/VLDL és HDL) és glükóz koncentrációja szignifikánsan megnő, a szervezet glükóz toleranciája csökken. Ezzel párhuzamosan fokozódik a máj TG, DG és ceramid (18:0 és 20:1) akkumulációja. Az egyszeresen telítetlen zsírsavat hordozó lipidek aránya megnő a telített zsírsavat hordozó lipid típusokhoz viszonyítva.
- A HFD hatására a plazma koleszterin tartalmát szabályozó PCSK9 szintje lecsökken a májban. A PCSK9 fehérje aktivitását gátló ANXA2 valamint az LDLR mennyisége megnő, ami hozzájárulhat a hepatociták fokozott lipidfelvételéhez.
- A HFD hatására megnő a keringő CD81⁺ és CD41⁺ sEV-k aránya.
- A HFD egerek testtömegével és a plazma koleszterin koncentrációjával párhuzamosan nő a plazma CD63⁺, CD81⁺, illetve AxV⁺ sEV-k aránya. Míg a kontroll egerek plazma CD63⁺, CD81⁺ sEV tartalma erős pozitív korrelációt mutatott a máj lipid tartalmával, a HFD egereknél fordított tendenciát láttunk az AxV és CD41 markerek esetében.
- *In vitro* sejtenyészetben a hepatociták CD81⁺ mEV és sEV szekréciója szignifikánsan megnő a hiperlipidémiára jellemző zsírsav összetételű tápfolyadékban.
- A ^{99m}Tc-HYNIC-duramicin komplexszel jelzett mEV és sEV *in vivo* eloszlásának kvantitatív vizsgálatával igazoltuk, hogy a keringésbe juttatott vezikulák

megközelítőleg 70 %-a a májban akkumulálódik. A májbeli feldúsulást az EV-k mérete nem befolyásolja.

- Az *in vitro* kísérletek szerint a máj nem-parenchimális sejtjeinek EV-felvételét befolyásolja az EV-k mérete. Az mEV-ket a Kupffer sejtek, az sEV-ket a máj szinuszoidális endotél sejtjei veszik fel intenzívebben. Hiperlipidémiás környezetben a máj nem-parenchimális sejtjeinek EV felvétele szignifikánsan csökken.

VII. Összefoglalás

A máj a szervezet alapvető anyagcsere szerveként fontos élettani funkciót tölt be. Központi szerepet játszik a keringő EV-k eliminálásában. HFD esetén a máj lipid terhelése és felhalmozása nő. A kialakuló szteatózis befolyásolhatja a máj EV dinamikáját. A különböző májsejtek szerepe az említett folyamatokban nem teljesen ismert. Munkánk során a máj EV felvételét és szekrécióját vizsgáltuk normo- és hiperlipidémia során.

A C57BL/6 egereket HFD tápon tartottuk 20 hétig. A HFD hatását a máj TG, DG és ceramid akkumulációjára HPLC-MS/MS módszerrel vizsgáltuk. Meghatároztuk a lipid anyagcserével asszociált *Pcsk9*, *Ldlr*, *Cd36* és *Anxa2* gének expressziós mintázatát. A keringő EV-k összetételét áramlási citométerrel jellemeztük. Az EV-k eloszlását kontroll egerekben, egy órával az intravénás ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin-EV komplex injektálást követően SPECT/CT-vel határoztuk meg. A hepatociták EV termelését, a hepatociták és nem-parenchimális májsejtek EV felvételét *in vitro* májsejt kultúrában vizsgáltuk kontroll körülmények között vagy előzetes zsírsavkezelést követően.

A magas zsírtartalmú diéta hatására a vizsgált TG, DG és egyes ceramid (18:0, 20:1) típusok mennyisége megnövekedett a májban. A PCSK9 expressziója csökkent, míg az LDLR, a CD36 és az ANXA2 mRNS és fehérje szintje megemelkedett a HFD tápon tartott egerekben. Ezen felül, a keringő CD81⁺ és CD41⁺ sEV-k aránya szignifikánsan megnőtt. A májsejttípusok szerepének tisztázására *in vitro* kísérleteket végeztünk. A primer hepatociták CD81⁺ mEV és sEV kibocsátása egyaránt megnövekedett hiperlipidémiára jellemző zsírsav összetétel mellett. A ^{99m}Tc -HYNIC-duramicin komplexszel jelölt mEV és sEV intravénás injektálását követően a májban halmozódott fel. *In vitro* eredményeink alapján, az mEV-eket a Kupffer sejtek, az sEV-eket elsősorban az LSEC-k vették fel. Hiperlipidémiás körülmények között mind a Kupffer sejtek, mind az LSEC-k csökkent EV-felvételt mutattak.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a HFD csökkentette a máj PCSK9 expresszióját, amely az LDLR és CD36 fehérje szint növelésével hozzájárulhat a májban történő lipidfelhalmozódáshoz. A hiperlipidémiás körülmények hatására nőtt a keringő és a hepatocita eredetű EV-k mennyisége. Ezzel szemben a májsejtek EV felvételi kapacitása csökkent.

VIII. Summary

The liver is an essential organ of the body that supports metabolism and immunity. It plays a central role in the elimination of circulating EVs and also contributes significantly to EV release. Western type, high fat diet can promote hyperlipidemia and increased fatty acid load in the liver. Hepatic steatosis may affect hepatic EV dynamics. The involvement of different liver cells in the mentioned processes is still unknown. In the present study, we examined EV uptake and release by the liver under normolipemia and hyperlipidemia.

C57BL/6 mice were kept on HFD for 20 weeks. The effect of HFD on the hepatic accumulation of TG, DG and ceramide lipid species was investigated using HPLC-MS/MS. We determined the expression pattern of *Pcsk9*, *Ldlr*, *Cd36* and *Anxa2* genes associated with lipid metabolism. The composition of circulating EVs was characterized using a flow cytometer. Control mice were intravenously injected with EVs labeled with ^{99m}Tc -HYNIC-duramycin, and one hour later their distribution was determined by SPECT/CT. The release and uptake of EVs was investigated in *in vitro* liver cell culture under control conditions and in response to treatment with free fatty acids.

As a result of the HFD, the amount of the measured TG, DG and ceramide (18:0 and 20:1) species has been increased in the liver. PCSK9 expression was decreased, while LDLR, CD36, and ANXA2 mRNA and protein levels were increased in mice fed with HFD. In addition, the proportion of circulating CD81⁺ and CD41⁺ sEVs was significantly elevated. In vitro experiments were performed to clarify the role of liver cell types. Both CD81⁺ mEV and sEV release from primary hepatocytes were increased at fatty acid concentrations characteristic for hyperlipidemia. After intravenous injection of mEVs and sEVs labeled with ^{99m}Tc -HYNIC-duramycin complex, they accumulated in the liver. Based on our in vitro results, mEVs were primarily taken up by Kupffer cells, and sEVs by liver sinusoidal endothelial cells. Under hyperlipidemic conditions, both Kupffer cells and liver sinusoidal endothelial cells showed reduced EV uptake.

In summary, we can conclude that the high-fat diet reduced the expression of PCSK9 in the liver, which could contribute to the accumulation of lipids in the liver by increasing LDLR and CD36 protein levels. Furthermore, our data suggest that hyperlipidemia increases the release of EVs and decreases uptake by liver cells.

IX. Irodalomjegyzék

- [1] György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68: 2667–2688.
- [2] Chargaff E, West R. (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *Journal of Biological Chemistry*, 166: 97–189.
- [3] Harding C, Heuser J, Stahl P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97: 329–339.
- [4] Pan BT, Johnstone RM. (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33: 967–978.
- [5] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Leijendekker R, Harding C V., Melief CJM, Geuze HJ. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183: 1161–1172.
- [6] Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. (2019) Extracellular vesicles: Mechanisms in human health and disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 30: 813–856.
- [7] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan M, Brigstock DR, Brisson A, Broekman MLD, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DRF, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chaudhuri AD, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ,

Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FAW, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D’Souza-Schorey C, Das S, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TAP, Duarte F V., Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, EL Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DCI, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AGE, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S ichi, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klink DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin I V., Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li ITS, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SLN, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-’t Hoen ENM, Noren Hooten N, O’Driscoll L, O’Grady T, O’Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Ostegaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BCH, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E,

- Polakovicova I, Poon IKH, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KMA, Ruggetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PRM, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BWM, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJC, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman K V., Wahlgren J, Watson DC, Wauben MHM, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žėkas V, Zhang J ye, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7: 1535750.
- [8] Buzas EI. (2022) The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 4: 1–15.
- [9] Pan B, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone R. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101: 942–948.
- [10] Wolf P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13: 269–288.
- [11] Fricke F, Buschmann D, Pfaffl MW. (2019) Isolation and characterization of extracellular vesicles. *Trillium Extracellular Vesicles*, 1: 18–26.

- [12] Busatto S, Vilanilam G, Ticer T, Lin W-L, Dickson DW, Shapiro S, Bergese P, Wolfram J. (2018) Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid. *Cells*, 7: 273.
- [13] Vukman K V., Ferencz A, Fehér D, Juhos K, Lőrincz P, Visnovitz T, Koncz A, Pálóczi K, Seregélyes G, Försönits A, Khamari D, Galinsoga A, Drahos L, Buzás EI. (2020) An implanted device enables in vivo monitoring of extracellular vesicle-mediated spread of pro-inflammatory mast cell response in mice. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10: e12023.
- [14] Ha D, Yang N, Nadithe V. (2016) Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 6: 287.
- [15] Lázaro-Ibáñez E, Faruqu F, Saleh A, Silva A, Tzu-Wen Wang J, Rak J, Al-Jamal K, Dekker N. (2021) Selection of Fluorescent, Bioluminescent, and Radioactive Tracers to Accurately Reflect Extracellular Vesicle Biodistribution in Vivo. *ACS Nano*, 15: 3212–3227.
- [16] Kang M, Jordan V, Blenkiron C, Chamley LW. (2021) Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10: e12085.
- [17] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 14265–14270.
- [18] Wong C, Stylianopoulos T, Cui J, Martin J, Chauhan VP, Jiang W, Popović Z, Jain RK, Bawendi MG, Fukumura D. (2011) Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 2426–2431.
- [19] Goodman TT, Olive PL, Pun SH. (2007) Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *International Journal of Nanomedicine*, 2: 265.

- [20] Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, Saji H, Takakura Y. (2017) Role of Phosphatidylserine-Derived Negative Surface Charges in the Recognition and Uptake of Intravenously Injected B16BL6-Derived Exosomes by Macrophages. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106: 168–175.
- [21] Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Jørgen Labori K, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, De Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527: 329.
- [22] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29: 341–345.
- [23] Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, Kalluri R. (2017) Exosomes Facilitate Therapeutic Targeting of Oncogenic Kras inPancreatic Cancer. *Nature*, 546: 498.
- [24] Clayton A, Harris C, Court J, Mason M, Morgan B. (2003) Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *European Journal of Immunology*, 33: 522–531.
- [25] Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. (2010) Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Research*, 70: 9621–9630.
- [26] Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology*, 14: 1036–1045.
- [27] Varga Z, Gyurkó I, Pálóczi K, Buzás EI, Horváth I, Hegedus N, Máthé D, Szigeti

- K. (2016) Radiolabeling of Extracellular Vesicles with ^{99m}Tc for Quantitative in Vivo Imaging Studies. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 31: 168–173.
- [28] Egli A, Alberto R, Tannahill L, Schibli R, Abram U, Schaffland A, Waibel R, Tourwé D, Jeannin L, Iterbeke K, Schubiger PA. (1999) Organometallic ^{99m}Tc -Aquaion Labels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity. *Journal of Nuclear Medicine*, 40: 1913–7.
- [29] Zhao M, Li Z, Bugenhagen S. (2008) ^{99m}Tc -labeled duramycin as a novel phosphatidylethanolamine- binding molecular probe. *Journal of Nuclear Medicine*, 49: 1345–1352.
- [30] Leiskau C, Baumann U. (2017) Structure, Function, and Repair of the Liver. *Diseases of the Liver and Biliary System in Children*, 1–17.
- [31] Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. (1990) Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochemical Journal*, 266: 313.
- [32] Shiratori Y, Tananka M, Kawase T, Shiina S, Komatsu Y, Omata M. (1993) Quantification of sinusoidal cell function in vivo. *Seminars in Liver Disease*, 13: 39–49.
- [33] Feingold KR, Grunfeld C. *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, 2000, MDTText.com, Inc., South Dartmouth, .
- [34] Trichopoulou A, Lagiou P. (1997) Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 961S-964S.
- [35] Sahng WP, Moon YA, Horton JD. (2004) Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 50630–50638.
- [36] Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Sahng WP, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 2995.

- [37] Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 18602–18612.
- [38] Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *34*: 154–156.
- [39] Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine*, 354: 1264–1272.
- [40] Grefhorst A, McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. (2008) Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *Journal of Lipid Research*, 49: 1303.
- [41] Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin N V., Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. (2006) Molecular Characterization of Loss-of-Function Mutations in PCSK9 and Identification of a Compound Heterozygote. *American Journal of Human Genetics*, 79: 514.
- [42] Katzmann JL, Gouni-Berthold I, Laufs U. (2020) PCSK9 Inhibition: Insights From Clinical Trials and Future Prospects. *Frontiers in Physiology*, 11: 1391.
- [43] Wiciński M, Żak J, Malinowski B, Popek G, Grzešek G. (2017) PCSK9 signaling pathways and their potential importance in clinical practice. *The EPMA Journal*, 8: 391.
- [44] Lipke K, Kubis-Kubiak A, Piwowar A. (2022) Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States-Current View of Knowledge. *Cells*, 11: 844.
- [45] Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Sock ETN, Ong H, Mayer G.

- (2015) PCSK9 Induces CD36 Degradation and Affects Long-Chain Fatty Acid Uptake and Triglyceride Metabolism in Adipocytes and in Mouse Liver. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35: 2517–2525.
- [46] Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R. (2014) Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3:.
- [47] Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, Vukman K V, Osteikoetxea X, Szabó-Taylor K, Németh A, Sperlágh B, Baranyai T, Giricz Z, Wiener Z, Turiák L, Drahos L, Pállinger É, Vékey K, Ferdinandy P, Falus A, Buzás EI. (2016) Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Scientific Reports*, 6: 24316.
- [48] Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A. (2011) Postprandial lipoprotein metabolism; VLDL vs chylomicrons. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412: 1306.
- [49] Tóth EÁ, Turiák L, Visnovitz T, Cserép C, Mázló A, W. Sódar B, Försönits AI, Petővári G, Sebestyén A, Komlósi Z, Drahos L, Kittel Á, Nagy G, Bácsi A, Dénes Á, Gho YS, Szabó-Taylor KÉ, Buzás EI. (2021) Formation of a protein corona on extracellular vesicles in blood plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10: e12140.
- [50] Fredrickson DS. (1971) An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Annals of Internal Medicine*, 75: 471–472.
- [51] Hu S, Wang L, Yang D, Li L, Togo J, Wu Y, Liu Q, Li B, Li M, Wang G, Zhang X, Niu C, Li J, Xu Y, Couper E, Whittington-Davies A, Mazidi M, Luo L, Wang S, Douglas A, Speakman JR. (2018) Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice. *Cell Metabolism*, 28: 415–431.
- [52] Speakman JR. (2019) Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity*, 43: 1491–1492.

- [53] Alves-Bezerra M, Cohen DE. (2017) Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 8: 1–22.
- [54] Liu TW, Heden TD, Matthew Morris E, Fritsche KL, Vieira-Potter VJ, Thyfault JP. (2015) High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for In Vitro Studies. *Lipids*, 50: 997–1008.
- [55] Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM, Jalali P, Kandasamy T, Prayitno N, Sherman M, Guindi M, Ma DWL, Heathcote JE. (2008) Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *Journal of Hepatology*, 48: 300–307.
- [56] Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese R V., Ory DS, Schaffer JE. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 3077–82.
- [57] Lyu K, Zhang D, Nozaki Y, Zhang Y, Bhanot S, Cline G, Samuel V, Shulman GI. (2018) Membrane sn-1,2 Diacylglycerol Mediates Lipid-Induced Hepatic Insulin Resistance In Vivo. *Diabetes*, 67: 243-LB.
- [58] Konstantynowicz-Nowicka K, Harasim E, Baranowski M, Chabowski A. (2015) New evidence for the role of ceramide in the development of hepatic insulin resistance. *PloS One*, 10: e0116858.
- [59] Pagadala M, Kasumov T, McCullough AJ, Zein NN, Kirwan JP. (2012) Role of Ceramides in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23: 365.
- [60] Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Galadari A, Thayyullathil F. (2013) Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids in Health and Disease*, 12: 1–16.
- [61] Newman LA, Sorich MJ, Rowland A. (2020) Role of Extracellular Vesicles in the Pathophysiology, Diagnosis and Tracking of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 9: 2032.

- [62] Zhao Y, Zhao MF, Jiang S, Wu J, Liu J, Yuan XW, Shen D, Zhang JZ, Zhou N, He J, Fang L, Sun XT, Xue B, Li CJ. (2020) Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload. *Nature Communications*, 11: 1–17.
- [63] Povero D, Yamashita H, Ren W, Subramanian MG, Myers RP, Eguchi A, Simonetto DA, Goodman ZD, Harrison SA, Sanyal AJ, Bosch J, Feldstein AE. (2020) Characterization and Proteome of Circulating Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers for NASH. *Hepatology Communications*, 4: 1263–1278.
- [64] Povero D, Eguchi A, Niesman IR, Andronikou N, De Jeu XM Du, Mulya A, Berk M, Lazic M, Thapaliya S, Parola M, Patel HH, Feldstein AE. (2013) Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Science Signaling*, 6: ra88.
- [65] Kakazu E, Mauer AS, Yin M, Malhi H. (2016) Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *Journal of Lipid Research*, 57: 233–245.
- [66] Dasgupta D, Nakao Y, Mauer AS, Thompson JM, Sehrawat TS, Liao CY, Krishnan A, Lucien F, Guo Q, Liu M, Xue F, Fukushima M, Katsumi T, Bansal A, Pandey MK, Maiers JL, DeGrado T, Ibrahim SH, Revzin A, Pavelko KD, Barry MA, Kaufman RJ, Malhi H. (2020) IRE1A Stimulates Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles That Promote Inflammation in Mice With Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 159: 1487-1503.e17.
- [67] Ibrahim SH, Hirsova P, Tomita K, Bronk SF, Werneburg NW, Harrison SA, Goodfellow VS, Malhi H, Gores GJ. (2016) Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology*, 63: 731–744.
- [68] Huang J, Zhao Q, Bu W, Zhang C, Yang Z, Zhang X, Zhang K. (2020) Ultrasound-assisted hydrolysis of lard for free fatty acids catalyzed by combined two lipases in aqueous medium. *Bioengineered*, 11: 241–250.
- [69] György B, Pálóczi K, Kovács A, Barabás E, Beko G, Várnai K, Pállinger É, Szabó-Taylor K, Szabó TG, Kiss AA, Falus A, Buzás EI. (2014) Improved circulating

- microparticle analysis in acid-citrate dextrose (ACD) anticoagulant tube. *Thrombosis Research*, 133: 285–292.
- [70] Spitler KM, Shetty SK, Cushing EM, Sylvers-Davie KL, Davies BSJ. (2021) Regulation of plasma triglyceride partitioning by adipose-derived ANGPTL4 in mice. *Scientific Reports*, 11: 1–15.
 - [71] Cabral F, Miller CM, Kudrna KM, Hass BE, Daubendiek JG, Kellar BM, Harris EN. (2018) Purification of Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells from Mouse Liver Perfusion. *Journal of Visualized Experiments*, 12: 56993.
 - [72] Olsavsky Goyak KM, Laurenzana EM, Omiecinski CJ. (2010) Hepatocyte differentiation. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 640: 115–138.
 - [73] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006) Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30: 3.22.1-3.22.29.
 - [74] Visnovitz T, Osteikoetxea X, Sódar BW, Mihály J, Lőrincz P, Vukman K V., Tóth EÁ, Koncz A, Székács I, Horváth R, Varga Z, Buzás EI. (2019) An improved 96 well plate format lipid quantification assay for standardisation of experiments with extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8: 1565263.
 - [75] Lynch RW, Hawley CA, Pellicoro A, Bain CC, Iredale JP, Jenkins SJ. (2018) An efficient method to isolate Kupffer cells eliminating endothelial cell contamination and selective bias. *Journal of Leukocyte Biology*, 104: 579–586.
 - [76] Kitka D, Mihály J, Fraikin JL, Beke-Somfai T, Varga Z. (2019) Detection and phenotyping of extracellular vesicles by size exclusion chromatography coupled with on-line fluorescence detection. *Scientific Reports*, 9: 1–7.
 - [77] Balaphas A, Meyer J, Sadoul K, Fontana P, Morel P, Gonelle-Gispert C, Bühler LH. (2019) Platelets and Platelet-Derived Extracellular Vesicles in Liver Physiology and Disease. *Hepatology Communications*, 3: 855.
 - [78] Hill MF, Bordonni B. *Hyperlipidemia*, 2020, StatPearls Publishing, Tampa, .
 - [79] Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. (1988) Diet-

Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes*, 37: 1163–7.

- [80] Alamri H, Patterson NH, Yang E, Zoroquiain P, Lazaris A, Chaurand P, Metrakos P. (2019) Mapping the triglyceride distribution in NAFLD human liver by MALDI imaging mass spectrometry reveals molecular differences in micro and macro steatosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411: 885.
- [81] Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 32345–32353.
- [82] Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. (2016) Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism*, 65: 1049–61.
- [83] Sarnyai F, Somogyi A, Gór-Nagy Z, Zámbo V, Szelényi P, Mátyási J, Simon-Szabó L, Kereszturi É, Tóth B, Csala M. (2020) Effect of cis- and trans-Monounsaturated Fatty Acids on Palmitate Toxicity and on Palmitate-induced Accumulation of Ceramides and Diglycerides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 2626.
- [84] Deevska GM, Rozenova KA, Giltaiy N V., Chambers MA, White J, Boyanovsky BB, Wei J, Daugherty A, Smart EJ, Reid MB, Merrill AH, Nikolova-Karakashian M. (2009) Acid sphingomyelinase deficiency prevents diet-induced hepatic triacylglycerol accumulation and hyperglycemia in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 8359–8368.
- [85] Kasumov T, Li L, Li M, Gulshan K, Kirwan JP, Liu X, Previs S, Willard B, Smith JD, McCullough A. (2015) Ceramide as a Mediator of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Associated Atherosclerosis. *PLOS ONE*, 10: e0126910.
- [86] Montefusco DJ, Allegood JC, Spiegel S, Cowart LA. (2018) Non-alcoholic fatty liver disease: Insights from sphingolipidomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504: 608–616.
- [87] Eng JM, Estall JL. (2021) Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells*, 10: 1805.

- [88] Kovanen PT, Bilheimer DW, Goldstein JL, Jaramillo JJ, Brown MS. (1981) Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 1194–1198.
- [89] Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. (1983) cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 7501–7505.
- [90] Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. (1983) Receptor-Mediated Endocytosis of Low-Density Lipoprotein in Cultured Cells. *Methods in Enzymology*, 98: 241–260.
- [91] Fox JC, McGill HC, Carey KD, Getz GS. (1987) In vivo regulation of hepatic LDL receptor mRNA in the baboon. Differential effects of saturated and unsaturated fat. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 7014–7020.
- [92] Koonen DPY, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CLM, Ong H, Vance DE, Dyck JRB. (2007) Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 56: 2863–2871.
- [93] Cariou B, Langhi C, Le Bras M, Bortolotti M, Lê KA, Theytaz F, Le May C, Guyomarc'H-Delasalle B, Zaïr Y, Kreis R, Boesch C, Krempf M, Tappy L, Costet P. (2013) Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets. *Nutrition and Metabolism*, 10: 1–11.
- [94] Seidah NG, Poirier S, Denis M, Parker R, Miao B, Mapelli C, Prat A, Wassef H, Davignon J, Hajjar KA, Mayer G. (2012) Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation. *PloS One*, 7: e41865.
- [95] Amput P, McSweeney C, Palee S, Phrommintikul A, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. (2019) The effects of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors on lipid metabolism and cardiovascular function. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 109: 1171–1180.

- [96] Tavirani MR, Tavirani MR, Azodi MZ. (2019) ANXA2, PRKCE, and OXT are critical differentially genes in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12: 131–137.
- [97] Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H. (2015) The Effect of Oleic and Palmitic Acid on Induction of Steatosis and Cytotoxicity on Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Physiological Research*, 64: S627-36.
- [98] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P. (2009) Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24: 830–40.
- [99] Racanelli V, Reherrmann B. (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 43: S54-62.
- [100] Song YS, Joo HW, Park IH, Shen GY, Lee Y, Shin JH, Kim H, Kim KS. (2015) Granulocyte-colony stimulating factor prevents the development of hepatic steatosis in rats. *Annals of Hepatology*, 14: 243–250.
- [101] Ordelleide AM, Gommer N, Böhm A, Hermann C, Thielker I, Machicao F, Fritsche A, Stefan N, Häring HU, Staiger H. (2016) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): A saturated fatty acid-induced myokine with insulin-desensitizing properties in humans. *Molecular Metabolism*, 5: 305–316.
- [102] Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. (2006) Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Promote Malignant Growth of Cells from Head and Neck Squamous Cell Carcinomas In vivo. *Cancer Research*, 66: 8026–8036.
- [103] Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Barr J, Mato JM, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. (2010) Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients. *PLoS ONE*, 5: e13577.

- [104] Hwang S, Wang X, Rodrigues RM, Ma J, He Y, Seo W, Park SH, Kim SJ, Feng D, Gao B. (2020) Protective and Detrimental Roles of p38 α MAPK in Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 72: 873.
- [105] Povero D, Eguchi A, Li H, Johnson CD, Papouchado BG, Wree A, Messer K, Feldstein AE. (2014) Circulating extracellular vesicles with specific proteome and liver microRNAs are potential biomarkers for liver injury in experimental fatty liver disease. *PLoS ONE*, 9: e113651.
- [106] Pirro M, Schillaci G, Paltriccia R, Bagaglia F, Menecali C, Mannarino MR, Capanni M, Velardi A, Mannarino E. (2006) Increased ratio of CD31+/CD42-microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26: 2530–2535.
- [107] Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, Kido H, Kagawa H, Fukuhara S. (1995) Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 116: 235–240.
- [108] Li J, Liu H, Mauer AS, Lucien F, Raiter A, Bandla H, Mounajjed T, Yin Z, Glaser KJ, Yin M, Malhi H. (2019) Characterization of Cellular Sources and Circulating Levels of Extracellular Vesicles in a Dietary Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology Communications*, 3: 1235–1249.
- [109] Martínez MC, Andriantsitohaina R. (2017) Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circulation Research*, 120: 1674–1686.
- [110] Wang W, Zhu N, Yan T, Shi YN, Chen J, Zhang CJ, Xie XJ, Liao DF, Qin L. (2020) The crosstalk: Exosomes and lipid metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 18: 1–12.
- [111] Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*, 3: 87–98.

- [112] Berger A, Araújo-Filho I, Piffoux M, Nicolás-Boluda A, Grangier A, Boucenna I, Real CC, Marques FLN, de Paula Faria D, do Rego ACM, Broudin C, Gazeau F, Wilhelm C, Clément O, Cellier C, Buchpignuel CA, Rahmi G, Silva AKA. (2021) Local administration of stem cell-derived extracellular vesicles in a thermoresponsive hydrogel promotes a pro-healing effect in a rat model of colocolutaneous post-surgical fistula. *Nanoscale*, 13: 218–232.
- [113] Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JHP, Toh WS. (2016) Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24: 2135–2140.
- [114] Han C, Zhou J, Liang C, Liu B, Pan X, Zhang Y, Wang Y, Yan B, Xie W, Liu F, Yu XY, Li Y. (2019) Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair. *Biomaterials Science*, 7: 2920–2933.
- [115] Hwang DW, Choi H, Jang SC, Yoo MY, Park JY, Choi NE, Oh HJ, Ha S, Lee Y-SS, Jeong JM, Gho YS, Lee DS. (2015) Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using (99m)Tc-HMPAO. *Scientific Reports*, 5: 15636.
- [116] Gangadaran P, Hong CM, Oh JM, Rajendran RL, Kalimuthu S, Son SH, Gopal A, Zhu L, Baek SH, Jeong SY, Lee SW, Lee J, Ahn BC. (2018) In vivo Non-invasive Imaging of Radio-Labeled Exosome-Mimetics Derived From Red Blood Cells in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9: 817.
- [117] Molavipordanjani S, Khodashenas S, Abedi SM, Moghadam MF, Mardanshahi A, Hosseinimehr SJ. (2020) 99mTc-radiolabeled HER2 targeted exosome for tumor imaging. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 148: 105312.
- [118] Rashid MH, Borin TF, Ara R, Alptekin A, Liu Y, Arbab AS. (2020) Generation of Novel Diagnostic and Therapeutic Exosomes to Detect and Deplete Protumorigenic M2 Macrophages. *Advanced Therapeutics*, 3: 1900209.
- [119] Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. (2016) Analysis and control of in vivo kinetics of exosomes for the development of exosome-based DDS. *Yakugaku Zasshi*, 136: 49–53.

- [120] Wiklander OPB, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, Vader P, Lee Y, Sork H, Seow Y, Heldring N, Alvarez-Erviti L, Edvard Smith CI, Le Blanc K, Macchiarini P, Jungebluth P, Wood MJA, El Andaloussi S. (2015) Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4: 1–13.
- [121] Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, Matsumoto A, Charoenviriyakul C, Takakura Y. (2015) Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4: 1–8.
- [122] Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. (2016) Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*, 240: 332–348.
- [123] Elvevold K, Smedsrød B, Martinez I. (2008) The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294: G391-400.
- [124] Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. (2010) Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 59: 258–266.

X. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz felhasznált publikációk:

Németh K, Varga Z, Lenzinger D, Visnovitz T, Koncz A, Hegedűs N, Kittel Á, Máthé D, Szigeti K, Lőrincz P, O'Neill C, Dwyer R, Liu Z, Buzás EI, Tamási V.

Extracellular vesicle release and uptake by the liver under normo- and hyperlipidemia.¹

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 78: 16 pp. 7589-7604. (2021)

IF: 9,234

Németh K, Tóth B, Sarnyai F, Koncz A, Lenzinger D, Kereszturi É, Visnovitz T, Kestecher BM, Osteikoetxea X, Csala M, Buzás EI, Tamási V.

High fat diet and PCSK9 knockout modulates lipid profile of the liver and changes the expression of lipid homeostasis related genes

NUTRITION & METABOLISM

A közlemény elbírálás alatt áll.

Egyéb publikációk:

Németh K, Petschner P, Pálóczi K, Fekete N, Pállinger É, Buzás EI, Tamási V.

Chronic Exposure to the Food Additive tBHQ Modulates Expression of Genes Related to SARS-CoV-2 and Influenza Viruses.

LIFE (BASEL) 12: 16 pp. Paper: 642 (2022)

IF: 3,253

¹ Reproduced with permission from Springer Nature.

Németh K*, Kazsoki A*, Visnovitz T, Pinke B, Mészáros L, Buzás EI, Zelkó R.

Nanofiber formation as a promising technology for preservation and easy storage of extracellular vesicles.

SCIENTIFIC REPORTS 12: 8 pp. Paper: 22012 (2022)

IF: 4,997

* megosztott elsőszerezőség

Hrabák A, Bögel G, Murányi J, Tamási V, Németh K, Szokol B, Kukor Z, Kardon T, Órfi L.

Decreasing effects of protein kinase inhibitors on the expression of NOS2 and inflammatory cytokines and on phagocytosis in rat peritoneal macrophages is partly related to repolarization.

MOLECULAR IMMUNOLOGY 153: 15 pp. 10-24. (2022)

IF: 4,174

XI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Tamási Violának sokéves, lelkiismeretes támogatásáért, mellyel végig kísérte doktori tanulmányaimat. Munkánk során megtanított az adekvát kutatói gondolkodásra, módszerekre, melyeket jövőbeli pályafutásom során is hasznosítani tudok.

Köszönöm Dr. Buzás Edit professzor asszonynak, hogy lehetővé tette a munkámat az intézetben és mindig készségesen segített az eredményeinket új nézőpontból megvizsgálni, kutatásunkban tovább lendülni.

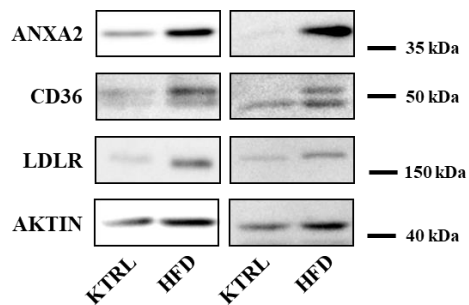
Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak, különös tekintettel Dr. Visnovitz Tamásnak, hogy minden problémás kérdésemre segített megoldást találni, valamint TEM és konfokális mikroszkópos képek elkészítésében. Továbbá Pálóczi Krisztinának, Koncz Anna PhD hallgató társamnak és Lenzinger Dorina TDK hallgatónak, hogy minden nap támogattak a labormunkában. Köszönöm Dr. Pállinger Évának és Fekete Nórának, hogy mindig segítettek áramlási citometriás feladatokban.

Ezúton szeretném Dr. Varga Zoltánnak az *in vivo* EV biodisztribúciós és FOBI mérések, Dr. Tóth Blankának a HPLC-MS/MS vizsgálatok elvégzését megköszönni.

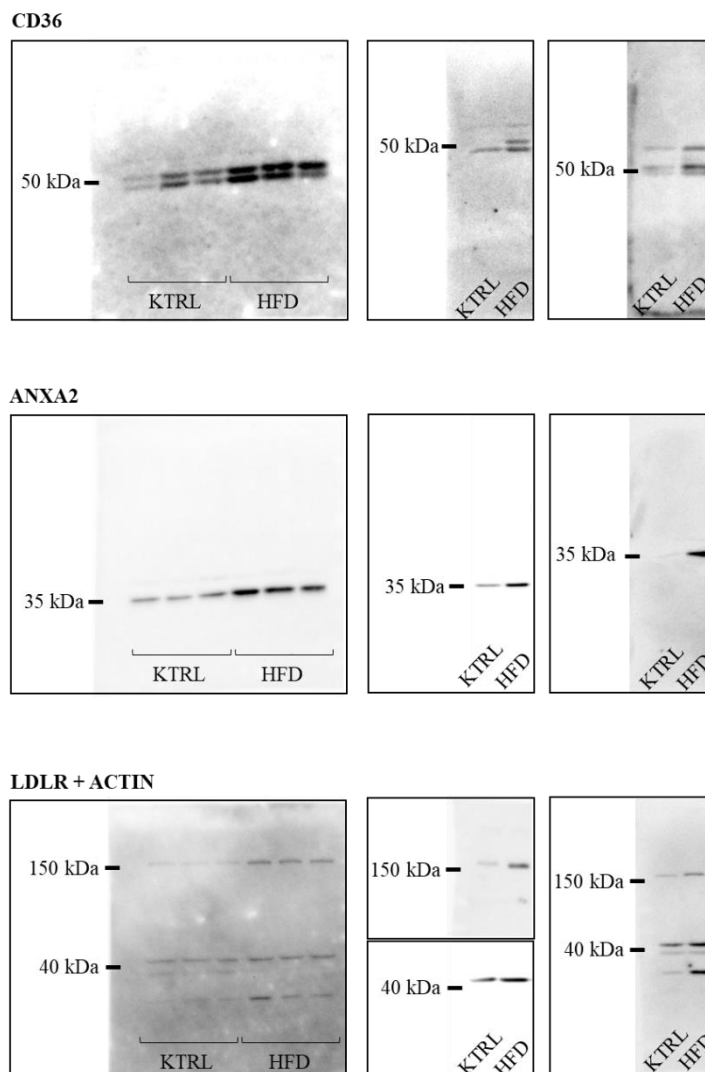
Hálásan köszönöm családomnak, hogy mindig biztosítottak támogatásukról.

XII. Függelék

1. A 20. ábráról hiányzó, további western blot képek



2. Vágatlan western blot képek



3. Grafikus absztrakt

