

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

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

A fejlett, nyugati társadalmakra jellemző magas zsírtartalmú táplálkozás számos betegséghez vezethet, pl. hiperlipidémia és elhízás. A hiperlipidémia megváltozott vérszír szinttel (átlagnál magasabb LDL, összkoleszterin, triglicerid, alacsonyabb HDL) jellemezhető. Ezen kórképben a máj lipid terhelése és felhalmozása nő. A máj elsősorban trigliceridek formájában tárolja a lipideket, emellett a bioaktív digliceridek, ceramidok szintje is meghatározó. A nagy mennyiségű lipid felhalmozás, a bioaktív lipidek arányának növekedése lipotoxicitással társulhat. Lipotoxikus körülmények hatására a máj anyagcseréje megváltozik, amely befolyásolhatja a máj extracelluláris vezikulák (EV) szekréciójának és felvételének dinamikáját.

Az EV-k kettős foszfolipid réteggel határolt, döntően gömb alakú partikulumok. Komplex molekuláris összetételük révén fontos szerepük van a sejt-sejt közötti kommunikációban. Membránnal elhatárolva képesek különböző molekulák szállítására. Az EV-k csoportosítása történhet biogenezisük vagy méretük alapján. Méretük szerint elkülönítettünk közepes EV-ket (mEV, 150 nm–1 μ m) és kis EV-ket (sEV, <150 nm).

A máj központi szerepet játszik az EV-k keringésből történő felvételében. A magas scavenger receptor expressziója révén a Kupffer sejtek hatékonyan veszik fel a negatív felszíni töltéssel rendelkező EV-ket. A hepatociták és a máj szinuszoidális endotél sejtek (LSEC-k) szerepe még nem teljesen ismert az említett folyamatban, pinocitotikus aktivitásuk révén elképzelhető, hogy képesek a kisebb méretű EV-k felvételére. Emellett a máj EV termelése is jelentős. A parenchimális és nem-parenchimális sejtek (NPC-k) is képesek EV szekrécióra. Szerepük egyaránt meghatározó fiziológias és patológias folyamatokban.

2. Célkitűzések

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

1. Krónikus (20 hét) magas zsírtartalmú diéta (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 koleszterin szintje?
- 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 a szabad zsírsavakkal történő (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?

3. Módszerek

Állatkísérletek

A hím, C57BL/6 egereket 6 hetes korukban véletlenszerűen két csoportra osztottuk, majd 20 hétig HFD-n (45 kcal% zsír) vagy normál rágcsáló tápon (10 kcal% zsír) tartottuk. A kísérlet időtartama alatt az egerek testtömegét két hetente megmértük. A HFD/kontroll diétát követően glükóz tolerancia tesztet végeztünk, megmértük a plazma éhomi LDL/VLDL és HDL koleszterin szintjét.

A máj génexpressziójának vizsgálata kvantitatív PCR-rel

A májszövet homogenátumból RNS-t izoláltunk, amelyből reverz transzkripcióval cDNS-t hoztunk létre. A következő gének expresszióját vizsgáltuk Taqman assay-jel: *Gapdh*, *Cd36*, *Ldlr*, *Pcsk9* és *Anxa2*. A génexpresszió változásának mértékét $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével, *Gapdh* belső kontroll használatával állapítottuk meg.

A máj PCSK9, CD36, LDLR és ANXA2 fehérje tartalmának meghatározása

A szolúbilis PCSK9 fehérje szint meghatározásához a májszövet mintákat proteáz gátlót tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk. A lizátum fehérje tartalmát LEGEND MAX™ Mouse PCSK9 ELISA Kit-tel határoztuk meg.

A membránkötött LDLR, CD36 és ANXA2 szintjét Western blot módszerrel vizsgáltuk. A májszövet mintákat proteáz inhibitort tartalmú sejt lízis pufferben homogenizáltuk. Az elektroforetikus szeparációt követően a fehérjéket polivinilidén fluorid membránra juttattuk. A fehérjéket indirekt eljárással detektáltuk, kemilumineszcens szignál alapján. A kapott csíkok

optikai denzitását ImageJ programmal határoztuk meg. Az egyes értékeket az aktin belső kontroll fehérjére normalizáltuk.

A máj lipidomikai vizsgálata HPLC-MS/MS segítségével

Májanként két, 1-2 mg tömegű szövetmintát gyűjtöttünk. A fehérje koncentráció meghatározásához a szövetmintát lízis pufferben vettük fel. A lizátumot lecentrifugáltuk, a felülúszó fehérje koncentrációját Pierce BCA módszerrel határoztuk meg. A HPLC-MS/MS analízishez a szövetmintát metanolos oldatban reszuszpendáltuk, majd ultrahangos homogenizációt követően Series200 Autosampler HPLC készülékkel vizsgáltuk a triglicerid, diglicerid és ceramid tartalmát. A máj lipid tartalmát a szövet fehérje tartalmára normalizáltuk.

Plazma eredetű EV-k szeparálása

A kontroll és HFD egerek véréből plazmát izoláltunk. Első lépésben differenciál centrifugálással elkülönítettük a sejttermelékeket, nagyméretű EV-eket (2.000 g), az mEV-eket (12.500 g) és az sEV-eket (100.000 g). Az mEV és sEV frakciókat tovább tisztítottuk méretkizárásos kromatográfiával. A gyártó utasításai szerint 1,5 ml poolozott EV frakciót gyűjtöttünk. Az EV-k jelenlétét áramlási citometriával és nanopartikulum követő analízissel (NTA) igazoltuk. A választott EV szeparálási módszer hatékonyságát transzmissziós elektron mikroszkóppal (TEM) is igazoltuk kontroll minták felhasználásával.

Primer májsejtek izolálása

A primer májsejteket *in situ*, anterográd, két lépéses kollagenáz perfúzióval izoláltuk. A hepatocitákat alacsony centrifugálási erővel (50 g) ülepítettük. A centrifugálást követően a felülúszót jégre félreraktuk NPC izoláláshoz. A sejt üledéket 40 %-os Percoll oldatban reszuszpendáltuk a halott sejtek

eltávolításához. 85 %-os életképesség felett a hepatocitákat I-es típusú kollagén rétegen tenyésztettük: EV felvétel vizsgálatához 24 lyukú- ($1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk), EV termelés analíziséhez 6 lyukú (1×10^6 sejt/lyuk) sejtenyésztő lemezen, szérummentes körülmények között (hepatocita monokultúra).

A hepatocita-NPC ko-kultúrához a letapadt hepatocitákat I-es típusú kollagénnel inkubáltuk, ezzel létrehozva egy kollagén-hepatocita-kollagén szendvics kultúrát. A hepatociták felülúszójából NPC sejteket izoláltunk differenciál centrifugálással (300 g). Az élő sejteket 33 %-os Percoll oldattal szeparáltuk. Az NPC-eket a hepatocitákra rétegeztük 1×10^5 sejt/lyuk koncentrációban.

Immuncitokémia

A különböző májsejtek jelenlétét a hepatocita-NPC ko-kultúrában immuncitokémiai módszerrel igazoltuk. A minták fixálását, blokkolását és permeabilizálását követően a hepatocitákat (albumin^+), Kupffer sejteket (F4/80^+) és LSEC-eket (CD146^+) a ko-kultúrában sejt specifikus markerek alapján direkt és indirekt jelöléssel azonosítottuk. A lemezeket Leica TCS SP8 konfokális lézer szkennig mikroszkóppal vizsgáltuk.

Kezelés szabad zsírsavakkal

A hiperlipidémiás körülményeket *in vitro* 16 órás FFA kezeléssel modelleztük 10 % BSA jelenlétében. Az olajsav koncentrációja $400 \mu\text{M}$ a palmitinsav végső koncentrációja $200 \mu\text{M}$ volt.

Olajvörös festés

A májsejtek lipid akkumulációját *in vitro* olajvörös festéssel határoztuk meg. A sejteket Nikon Diaphot TMD Inverted Mikroszkóppal vizsgáltuk. Az

olajvörössel festett lipidcseppek relatív méretét ImageJ programmal határoztuk meg.

Albumin, húgysav és citokin termelés vizsgálata

A hepatociták albumin termelését a kondicionált médiumból Mouse Albumin ELISA Kit segítségével mértük. A húgysav koncentrációt Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay Kit-tel határoztuk meg. A májsejtek citokin termelését a kondicionált médiumból LEGENDplex™ Mouse Macrophage/Microglia Panel 13-plex kittel vizsgáltuk.

Hepatocita eredetű EV-k szeparálása

Az EV-ket 24 órával a szérum megvonást követően kontroll és FFA kezelt sejt kondicionált médiumból szeparáltuk. A plazma eredetű EV-k szeparálásánál ismertetett módszert választottuk kis módosításokkal. A 2000 g centrifugálást megelőzően a sejteket centrifugálással (300 g) és szűréssel (5 μ m) távolítottuk el. Az EV-k jelenlétét áramlási citometriával és NTA-val igazoltuk. A választott EV szeparálási módszer hatékonyságát TEM-mel is igazoltuk kontroll minták felhasználásával.

HEK293T-palmGFP eredetű EV-k szeparálása

A kondicionált médiumot 24 órával FBS megvonást követően gyűjtöttük. Első lépésben a sejteket centrifugálással (300 g) és szűréssel (5 μ m) eltávolítottuk. Ezt követően differenciál centrifugálással a nagyméretű EV-ket (2.000 g) és mEV-ket (12.500 g) szeparáltunk. Az mEV-k felülúszóját TFF-Easy készülékkel koncentráltuk, majd ultracentrifugálással sEV-ket (100.000 g) szeparáltunk. Az EV-k jelenlétét TEM-mel, áramlási citometriával és NTA-val igazoltuk.

Az EV minták karakterizálása MISEV2018 irányelvei alapján

Az EV-k morfológiáját TEM-mel vizsgáltuk. Az EV-ket formvar bevont rácsra helyeztük, majd 2 %-os glutáraldehiddel fixáltuk. A kontrasztot első lépésben uranil oxaláttal növeltük. A mintákat tovább kontrasztoltuk és beágyaztuk 4 %-os uranil acetát és 2 %-os metil cellulóz keverékében.

A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k CD81 és CD63 expresszióját immun-TEM-mel határoztuk meg. Az EV-ket formvar bevont rácsra helyeztük, majd 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. 2 %-os szacharózzal történő blokkolást követően indirekt eljárással detektáltuk a CD81 és CD63 markereket. Majd az előző bekezdésben ismertetett módon kontrasztoltuk és beágyaztuk a mintákat.

Az EV frakciók méreteloszlását, részecskeszámát NTA-val határoztuk meg, ZetaView PMX-120 készülékkel.

Az EV-k fehérje tartalmát Micro BCA módszerrel, lipid tartalmát szulfoszfó-vanillin lipid assay módszerrel mértük meg.

Az EV asszociált markerek vizsgálatához az EV-ket latex gyöngyhöz kötöttük. Előkísérletben meghatároztuk az optimális EV/gyöngy arányt, amely szemikvantitatív elemzési módot tett lehetővé. Az EV-vel fedett gyöngy felületének blokkolást követően direkt és indirekt módszerrel jelöltük az EV-asszociált markereket (AnnexinV, CD81, CD63, CD9 és ApoB). A HEK293T-palmGFP eredetű EV-k GFP expresszióját áramlási citométerrel és FOBI készülékkel határoztuk meg.

Az EV felvétel vizsgálata áramlási citometriával

Az EV felvétel kinetikáját hepatocita-NPC ko-kultúrában határoztuk meg normolipémiás körülmények között. A kinetikai vizsgálat alapján 16 óra FFA kezelést követően 1 µg lipid tartalmú az mEV-t és sEV-t 24 órán keresztül inkubáltuk a sejtekkel. A májsejteket felszedtük a tenyésztő lemez felszínéről.

A hepatocitákat alacsony centrifugálási erővel választottuk el az NPC sejtektől (50 g). A hepatociták felülúszójából centrifugálással összegyűjtöttük az NPC-ket (300 g). Sejtspecifikus markerek alapján elkülönítettük a Kupffer sejteket (F4/80⁺) és az LSEC-eket (CD146⁺). A májsejtek EV-k felvételét a sejtek GFP szignálja alapján határoztuk meg.

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

A HEK293T-palmGFP eredetű mEV-k/sEV-k radioizotópos jelölése ^{99m}Tc-HYNC-duramicin kittel történt. A jelölt EV-eket méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk. Az EV-eket 1-1,5 ml PBS oldatban gyűjtöttük össze. C57BL/6 egerekbe, farok vénán keresztül 12±3 MBq ^{99m}Tc-HYNC-duramicinnel jelölt EV-t injektáltunk. A CT és az azt követő SPECT mérés egy órával az injektálást követően történt. A rekonstruált képeket Fusion és VivoQuant szoftverekkel analizáltuk: a megfelelő vizsgálati régiókat manuálisan a szervek fölé helyeztük a CT felvételen. Az EV-k eloszlását a szívben, tüdőben, vesékben, húgyhólyagban, májban, lépben és a csontokban is megmértük.

Statisztikai analízis és használt grafikai szoftverek

Az értékeket átlag±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 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). 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.

4. Eredmények

HFD vagy kontroll tápon tartott egerek karakterizálása

A HFD egerek éhomi glükóz szintje szignifikánsan megnövekedett, a glükóz toleranciája lecsökkent. A plazma LDL/VLDL és HDL koleszterin szintje megemelkedett. Hiperlipidémiás körülmények hatására egy hét után szignifikánsan megnövekedett az egerek testsúlya, amely a kísérlet időtartalma alatt végig magasabb maradt.

A máj lipiddakkumulációjának vizsgálata

A máj triglicerid és diglicerid tartalma mind a vizsgált altípusok, mind az összemennyiséget tekintve szignifikánsan megemelkedett. A ceramidok összemennyisége nem változott meg. A CER 18:0, CER 20:1 ceramid aránya szignifikánsan megnövekedett. A detektált egyszeresen telítetlen trigliceridek és digliceridek aránya nőtt, míg a telítetteké csökkent, a ceramidok szintje nem változott meg.

A máj PCSK9, LDLR, ANXA2 és CD36 expressziójának vizsgálata

A HFD hatására a PCSK9 expressziója csökkent, amellyel párhuzamosan annak endogén inhibitora az ANXA2 szintje nőtt. A CD36 és LDLR felszabadulva a gátlás alól magasabb szintet mutatott.

A hiperlipidémia hatása az egér vérplazma EV tartalmára

Az mEV-vel fedett pozitív gyöngyök aránya alacsony volt AnnexinV, CD63 és CD81 markerek alapján, a hiperlipidémiás körülmények nem befolyásolta mennyiségüket. Az ApoB a gyöngyök közel 80 %-án jele volt. Az sEV-vel fedett pozitív gyöngyök aránya magasabb volt a CD63 és CD81 markerek alapján. A HFD szignifikánsan megemelte a CD81⁺ gyöngyök

százalékos arányát. Az ApoB a gyöngyök 100 %-án jelen volt, átlag fluoreszcencia értéket tekintve a HFD csoportban magasabb jelet detektáltunk, ami jól korrelál a plazma LDL/VLDL tartalmával.

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

A HFD egerek testtömege pozitívan korrelált a plazma CD63⁺ és CD81⁺ sEV tartalmával. A kontroll egerek plazma LDL/VLDL tartalma negatív összefüggést mutatott a CD63, CD81 és ApoB markerekre, míg a HFD csoportban pozitív összefüggést láttunk. A kontroll csoportban pozitív korrelációt találtunk a máj triglicerid tartalma és a plazma sEV tartalma között (CD63, CD81 és ApoB), a HFD egereknél fordított tendenciát találtunk a digliceridek és az AnnexinV⁺ és CD41⁺ sEV-k között.

FFA kezelés hatása a májsejt kultúrákra

A hepatocita-NPC ko-kultúrában konfokális mikroszkóppal azonosítottuk a hepatocitákat (albumin⁺), Kupffer sejteket (F4/80⁺) és LSEC-eket (CD146⁺) sejt specifikus markerek alapján. A Kupffer sejtek (22,9±4,8 %) és LSEC-k (39,9±4,8 %) arányát áramlási citométerrel határoztuk meg.

A hepatociták szérum mentes körülmények között kuboidális morfológiát mutattak. Citoplazmájukban lipid csepp akkumuláció volt látható olajvörös festés alapján. 16 óra FFA kezelést követően a lipid cseppek mérete szignifikánsan megnövekedett. Ezzel szemben az NPC-k láthatóan nem halmoztak fel zsírcseppeket.

A kísérleti idő alatt a kontroll és az FFA kezelt hepatociták albumin termelésében nem láttunk különbséget. 16 óra FFA kezelést követően a hepatociták húgysav termelése szignifikánsan megnövekedett.

A májsejtek citokin termelésének vizsgálata

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. 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.

A hiperlipidémia hatása a hepatociták EV termelésére

A máj domináns sejttípusának a hepatocitáknak EV termelését *in vitro* primer sejt kultúrában vizsgáltuk. Az AnnexinV⁺ 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.

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

A HEK293T-palmGFP eredetű ^{99m}Tc-HYNIC-duramicin jelölt 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: $5,5 \pm 1,0$ %).

EV felvétel hepatocita monokultúrában normo- és hiperlipidémiás környezetben

A kinetikai vizsgálat szerint a hepatociták a HEK293T-palmGFP eredetű mEV és sEV felvételi maximumát 24 óra után érik el. A hepatociták egyaránt

képesek voltak az mEV-k és sEV-k felvételére, amelyet a hiperlipidémiás körülmények nem befolyásoltak.

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

A kinetikai vizsgálat szerint a hepatociták, Kupffer sejtek és LSEC-k a HEK293T-palmGFP eredetű mEV és sEV felvételi maximumát 24 óra után érik el. A Kupffer sejtek inkább az mEV-eket vették fel, míg az LSEC-k szerepe az sEV felvételben volt kiemelkedő. A hiperlipidémiás körülmények szignifikánsan lecsökkentették a Kupffer sejtek mEV és az LSEC-k sEV felvételét.

5. 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 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 triglicerid, diglicerid és ceramid (18:0 és 20:1) akkumulációja. Az egyszerűen 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 AnnexinV⁺ 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 AnnexinV 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 NPC-k EV-felvételét befolyásolja az EV-k mérete. Az mEV-ket a Kupffer sejtek, az sEV-ket az LSEC-k veszik fel intenzívebben. Hiperlipidémiás környezetben a máj NPC-k EV felvétele szignifikánsan csökken.

6. 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.

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

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 elsőszerzőség

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