**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

# A makrofágok efferocitózis folyamatának módosulása elhízás során

**Sós László**

**Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna**

**DEBRECENI EGYETEM**
**Fogorvostudományi Doktori Iskola**

**Debrecen, 2025**

# A MAKROFÁGOK EFFEROCITÓZIS FOLYAMATÁNAK MÓDOSULÁSA ELHÍZÁS SORÁN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Sós László okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsanna, az MTA doktora

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Dr. Röszer Tamás, az MTA doktora

A bírálóbizottság:
elnök: Prof. Dr. Nánási Péter, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora
Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora
Dr. Röszer Tamás, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” Épület tanterme, 2026. január 22. 13:00.

# 1. BEVEZETÉS

Testünkben naponta több milliárd elhalt sejt kerül eltakarításra (efferocitózis). Az efferocitózis része a normál szöveti homeosztázisnak, hiszen hozzájárul a szöveti integritás fenntartásához, a fagocitáló makrofágok által kibocsájtott molekulák révén az elhalt sejtek utánpótlásához, és a gyulladási program folyamatos gátlásához is. Az elhízásra krónikus alacsony szintű gyulladás kialakulása jellemző a zsírszövetben, melynek kiváltó oka az, hogy az egyre növekvő, elsősorban hasi zsírsejtek a túlzott lipid terhelés hatására apoptózissal és nekrózissal elhalnak. Az elhaló zsírsejtek kemotaktikus és gyulladásos jelek kibocsájtásával csontvelői eredetű makrofágokat hívnak be a vérpályából gyulladást indítva. A zsírszöveti makrofágok az elhalt zsírsejtek eltakarítása során az extracelluláris vezikulumokba csomagolt lipideket is átveszik. Ha a makrofágok hosszútávon magas lipid mennyiségnek vannak kitéve, pro-inflammatorikus citokinek termelése által fokozzák és fenntartják a gyulladást, másrészt befolyásolják az adipociták adipokin termelését, mely együttesen csökkent inzulin érzékenységhez vezet (2-es típusú diabétesz). A széteső zsírsejtekből a makrofágok zsírtelítettsége esetén a zsír a májszövetbe kerül (zsírmáj). Az elhízásban megemelkedik a vérben a szabad telített zsírsavak koncentrációja is, ami csökkenti a makrofágok efferocitózis képességét. Ez fokozza az egész szervezetben a gyulladásos hajlamot, ami miatt az elhízás gyakran társul egyéb krónikus gyulladásos megbetegedésekkel, mint például az ateroszklerózis, krónikus obstruktív tüdőbetegség, oszteoartritisz, periodontitisz, vagy elhúzódó sebgyulladás. Disszertációm első részében a palmitát apoptotikus sejtek eltakarítására gyakorolt gátló hatását vizsgáltam.

A Mer tirozin-kináz egy a szöveti és az M2 makrofágok által expresszált efferocitózis receptor. Részt vehet a gyulladás gátlásában és a lipidet tartalmazó extracelluláris vezikulák felvételében is, ily módon csökkentve a zsírsejtek zsírterhelését. A feltételezésünk az volt, hogy a makrofág Mer védő szerepet tölt be a zsírszöveti homeosztázis megtartásában, így disszertációm második részében azt vizsgáltam, hogy a Mer hiánya befolyásolja-e a metabolikus szindróma kialakulását magas zsírtartalmú étrenden tartott egerekben.

# 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 2.1. Az elhízás

Az elhízás olyan kórállapot, amelyben a felesleges zsír felhalmozódása a szervezetben olyan mértékű, hogy egészségkárosító hatással bírhat. A klinikai gyakorlatban az elhízás mértékének meghatározásához leggyakrabban a testtömegindexet (BMI-t) használják mérőszámként. A BMI az egyén testtömegének és magasságának arányát mutatja. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) besorolása szerint 25-29,9-ig terjedő BMI túlsúlyos, 30-39,9-ig elhízott, 40 fölött pedig súlyosan elhízott állapotot jelent.

Bár az esetek többségében az elhízás kiváltó oka a túlzott energiabevitel és a mozgásszegény életmód, különböző mértékben genetikai, epigenetikai, családi tényezők és a mikrobiom megváltozása is hozzájárulhatnak kialakulásához. A családi háttér kutatása során megfigyelték, hogy azoknál a személyeknél, akiknek a családjában előfordult korábban magas vérnyomás, elhízás, diabétesz vagy stroke nagyobb eséllyel alakul ki elhízás vagy hiperlipidémia. Az elmúlt években több, mint 100 olyan gént fedeztek fel, melyek kapcsolatba hozhatók a megemelkedett BMI-vel. Számos publikáció igazolja, hogy az elhízásra hajlamosító génekre hatással van a környezet, az életmód, és a különböző gyógyszeres kezelések is.

## 2.2. A zsírsejtek típusai

A zsírsejteknek 3 típusa van: fehér, bézs és barna adipociták. A köztük lévő különbség zsír metabolizmusukban, termogenikus kapacitásukban, méretükben, morfológiájukban, elhelyezkedésükben, illetve különböző funkciójukban mutatkozik meg. Testünk zsírszövetének nagy részét a fehér zsírszövet alkotja. A fehér zsírszövet az energiát trigliceridek formájában tárolja. Alacsony kalóriabevitelnél a raktározott zsír oxidációja energiát biztosít a szervezet működéséhez. A fehér zsírszövet méretének és morfológiájának a változása széles skálán mozog, és megfigyelték, hogy szoros kapcsolat mutatható ki a fehér zsírszövet tömegének a növekedése és az inzulinrezisztencia, a kettes típusú diabétesz és a magas vérnyomás kialakulásának a valószínűsége között. A barna zsírszövet energetikailag aktívabb, több mitokondriumot tartalmaz és hő formájában képes energiát felszabadítani alacsony hőmérsékletű körülmények között. Az adipociták harmadik típusa a bézs adipociták, amelyek a fehér adipocitákból jönnek létre termogenikus stimulálás hatására. Ezt a folyamatot barnulásnak nevezzük. Ez a folyamat reverzibilis, és a mitokondriumok autofágiájának szabályozása kulcsszerepet játszik benne. A bézs adipociták a barna adipocitákkal bizonyos

tulajdonágokban megegyeznek, mint például a szétkapcsoló fehérje 1 (UCP1) kifejeződése, multilokuláris lipid cseppek kialakulása, vagy a magas mitokondrium szám azonban a lokációt, markereket, illetve a termogenikus mechanizmusokat tekintve is számos különbséget mutatnak.

### 2.3. Hipertrófia kialakulása a zsírszövetben

Az elhízást alapvetően a zsírszövet megnagyobbodása jellemzi. A zsírszövet tömege két mechanizmus által növekedhet: hiperplázia és hipertrófia. Hiperplázia során a zsírsejtek száma, míg hipertrófia során a zsírsejtek mérete növekszik Az előbbi egészséges zsírraktározást, míg az utóbbi, elsősorban a hasi zsírszövethez köthetően, metabolikus szindrómához vezető zsírlerakódást eredményez. A hipertrófiás típusú raktározásért részben a hasi zsírszövetben jobban kifejeződő 11β-hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitást teszik felelőssé. A hipertrófia folyamatában számos jelátviteli útvonal vesz részt.

Az egyik ilyen útvonal az inzulin jelátviteli útvonala. Az inzulin zsírszövet hipertrófiáját elősegítő hatása úgy érvényesül, hogy egyrészt gátolja a zsír lebontását (lipolízis), másrészt elősegíti a zsírsavszintézist, és fokozza a zsír tárolását a zsírszövetben. Az inzulin negatívan szabályozza a lipolízist, és elősegíti a zsírsavak triacilglicerol formájában történő tárolását. A lipolízis aktiválása során megnő a ciklikus adenozin-monofoszfát (cAMP) másodlagos hírvivő molekula szintje, amely elősegíti a hormonszenzitív lipáz enzim foszforilációját, ezáltal az aktivációját. Az inzulin negatív szabályozó hatása úgy érvényesül, hogy aktiválja a foszfodiészteráz 3B enzimet, amely csökkenti cAMP szintet. Csökkent cAMP szint esetén nem lesz aktív a hormonszenzitív-lipáz, így a lipolízis is gátolt lesz.

A perilipin 1 fehérje nagy mértékben expresszálódik az adipocitákban és a lipidcseppek megkötésében, valamint szintén a lipolízisben van szerepe. A perilipin 1 fehérjét foszforilációval aktiválja a protein kináz A. Ez a foszforiláció az inzulin jelátviteli útvonal aktiválódásának hatására elmarad, így a lipolízis gátolva lesz, amely szintén a lipid felhalmozódását segíti a zsírsejtekben.

A zsírszövet hipertrófiájának másik fontos szabályozója a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma (PPARγ), amely egy sejtmagban található transzkripciós faktor, és nélkülözhetetlen az adipogenezisben, a lipid metabolizmusban, a gyulladásos folyamatok szabályozásában és az adipociták metabolikus homeosztázisának fenntartásában. A PPARγ heterodimert alkot a retinoid X receptorral és specifikus DNS szekvenciákhoz kapcsolódva fokozza az adipociták differenciációjában és érési folyamatában résztvevő gének expresszióját Egyes gének expressziójának a fokozásával (pl. lipoprotein lipáz, CD36) elősegíti az adipociták általi zsírsav felvételt és tárolást.

Az adipociták fejlődésének fontos szabályozói a jelátalakító és transzkripció aktivátor fehérjék (STAT-ok). Az adipocitákban a STAT1, 3, 5A, 5B és 6 fehérje fejeződik ki. A STAT5 olyan gének

expresszióját fokozza, mint például az acil CoA oxidáz, zsírsav-szintetáz, vagy az adiponektin, egy inzulinérzékenységet fokozó adipokin. A STAT1 fehérje a magas zsírtartalmú diéta esetében fontos, amikor az INFγ szint megemelkedett. Az INFγ szint emelkedését a viscerális szírszövetbe migráló immunsejtek okozzák, melynek hatására a STAT1 jelátviteli útvonal aktiválódik és gátolja az adipociták differenciálódását. A megnövekedett STAT3 fehérje expresszió szintén az adipogenezis korai szakaszában figyelhető meg és az adipociták differenciálódásának a mértékét fokozza.

A növekedési és differenciációs faktorok (GDF-ek) a transzformáló növekedési faktor-béta fehérjék (TGFβ) családjába tartoznak és fontos szerepet töltenek be az adipociták funkcióiban és metabolizmusában. A GDF-15 részt vesz az energia homeosztázis fenntartásában, a testsúly szabályozásában, és hiányában 2-es típusú diabétesz alakul ki, valamint a zsírszövet tömegének a növekedése figyelhető meg. A GDF-15 elősegíti a makrofágok M2 antiinflammatorikus polarizációját is a zsírszövetben, és fokozza az inzulin érzékenységet. A GDF-5 az elhízás elleni védelemben is résztvevő kritikus fehérje. Túlzott expressziója sovány fenotípus kialakulásához vezet, véd a diéta által kiváltott elhízás kialakulásával szemben, többek között a bézs adipociták kifejlődésének indukcióján keresztül. A fokozott GDF-5 expresszió elősegíti a bézs adipociták kifejlődését. A GDF-3 a GDF-5-höz hasonlóan a zsírszövet homeosztázisának fenntartásáért, illetve az adipociták energiaszabályozásáért felelős. Lipidterhelés hatására a zsírtömeg növekedését okozza a lipidtárolás fokozásán keresztül, ezért hiányában csökkent zsírtömeg növekedés figyelhető meg.

A növekedési hormon egy polipeptid, melyet az agyalapi mirigy termel. A növekedési hormon elősegíti az adipociták proliferációját és a preadipociták differenciálódását, továbbá a lipolízist a lipoprotein lipáz enzim gátlásával, ezáltal gátolva a trigliceridek felhalmozódását az adipocitákban, illetve a növekedési hormon aktiválja a hormonszenzitív lipázt, amelynek köszönhetően lehetőség van a trigliceridek felszabadítására adipocitákból lipolízis által.

A zsírszövet növekedésére ható szignálok által indított jelpályák egy része az intracelluláris cAMP szint szabályozásában vesz részt, míg mások az mTOR működését befolyásolják. Az mTOR (emlős rapamicin-célpont) egy protein kináz, amely két nagy komplexből áll: mTORC1 és mTORC2. Az adipociták esetében az mTOR részt vesz az adipogenezis, a lipid metabolizmus, a termogenezis szabályozásában, illetve az inzulinérzékenység fokozásában. Az mTOR adipogenezisben betöltött esszenciális szerepét mutatja, hogy az mTOR hiányában csökken a zsírszövet mennyisége és a zsírsejtek mérete, továbbá képes fokozni a fehér zsírszövet barnulási folyamatát a PPARγ expressziójának szabályozásán keresztül. Az mTORC1 a szterol szabályozó elemhez kötődő fehérjéken (SREBP-ken) keresztül is képes kifejteni a hatását, amelyek a zsírsav és triglicerid szintézis szabályozásában résztvevő transzkripciós faktorok. Ezek a transzkripciós faktorok a lipogenezisben résztvevő gének expresszióját szabályozzák. Gátlásuk szintén csökkent adipocita méretet eredményez.

## 2.4. Efferocitózis

Efferocitózis alatt az 0,5µm-nél nagyobb részecskék felismerését és bekebelezését értjük plazma membrán eredetű vezikulumokba, amelyet fagoszómának nevezünk. Testünkben a sejtek nagy részének a felszínén olyan molekulák találhatók, amelyek normál állapotban megakadályozzák a sejtek makrofágok általi bekebelezését. Ezeket a molekulákat „ne egyél meg" szignáloknak nevezzük. Ilyen molekulák például a CD24, CD31, CD47, fő hisztokompatibilitási komplex I (MHCI), programozott halál ligand 1 (PD-L1) és a szalicilsav.

Az fagocitózis első lépése a makrofágok migrációja a bekebelezendő sejtekhez „találj meg" szignálok hatására, melyek normál fiziológiás körülmények között intracellulárisan találhatóak meg. Ilyen molekulák például a nukletodikok, mint az adenozin-trifoszfát (ATP), uridin-trifoszfát (UTP) vagy egyéb molekulák, mint a lizofoszfatidilkolin, szfingozin 1-foszfát, fraktalkin, monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1). A sejthalál következtében ezen molekulák az apoptotikus program részeként felszabadulnak az apoptotikus sejtekből, és egy grádienst létrehozva elősegítik a makrofágok migrációját az apoptotikus sejtekhez.

Az „egyél meg" szignálok elősegítik az eltakarítani kívánt sejtek elkülönítését az egészséges sejtektől. A legtöbbet tanulmányozott „egyél meg" szignál a foszfatidilszerin (PS). A PS normál esetben a plazmamembrán belső felszínén helyezkedik el a flippáz enzimeknek köszönhetően, és apoptózis során a plazmamembrán külső felszínére transzlokálódik. A PS fagocitikus receptorok általi felismerése történhet direkt vagy indirekt módon hídképző molekulák segítségével. A PS-t direkt módon képes felismerni az agy specifikus angiogenezis inhibitor 1 (BAI1), a T-sejt immunoglobulin mucin fehérje 4 (TIM-4) és a stabilin 2. Indirekt módon ismeri fel a Mer tirozin-kináz (MerTK) és az α(v)β(3) integrin receptor. Hídképző molekulák a Gas6, a tej zsírcsomó globulin-EGF 8-as faktor (MFG-E8), a protein S, és a komplement komponens 1q (C1q).

A programozott sejthalál során az apoptotikus sejtek felszínén megjelenő másik „egyél meg" szignál a kalretikulin, melyet a makrofágok felszínén lévő CD91 receptorok ismernek fel. Az apoptózis során kaszpáz enzimek hatására a citoszolból a plazmamembrán külső felszínére transzlokálódik a PS-el együtt. Az intracelluláris adhéziós molekula 3 (ICAM3) és az oxidált alacsony sűrűségű lipoproteinek (OxLDL), amelyek oxidált lipideket tartalmaznak szintén jelen lehetnek az apoptotikus sejtek felszínén ligandként szolgálva a makrofágokon megtalálható receptoroknak. Az utóbbi évek kutatásai alátámasztották a foszfatidil inozitolok „egyél meg" szignálként betöltött funkcióját is, melyet a CD14 pozitív makrofágok képesek felismerni.

A bekebelezni kívánt sejtek felismerését követően olyan jelátviteli útvonalak aktiválódnak a makrofágokban, amelyek az aktin citoszkeleton átrendeződéshez vezetnek elindítva a bekebelezés folyamatát és a fagocitikus kehely kialakulását. A folyamat kis GTPázok által irányított. A Rho

családba tartozó GTPázok molekuláris kapcsolóként működnek. Guanozin-trifoszfát (GTP) kötött állapotban aktívak, és guanozin-difoszfát (GDP) kötött állapotban inaktívak. A guanin kicserélő faktorok segítik az aktív állapot kialakulását, míg GTP-áz aktivitásuk kapcsolja ki őket. Ezutóbbiak aktivitását GTPáz aktiváló proteinek szabályozzák. A RhoA fokozza az akto-miozin kontraktciót és az F-aktin stabilizációt a korai szakaszban, azonban később a folyamat negatív szabályozójaként funkcionál. A Rac1 elősegíti a F-aktin elágazódását, amely elengedhetetlen a lamellopódium kialakulásához. Végül a CDC42 a rövid aktin filamentumok és a filopódium kialakulásához szükséges. A Rac1 és CDC42 fő effektorai a Wiskott-Aldrich szindróma protein (WASP), Wiskott-Aldrich szindróma protein család verprolin homológ (WAVE) komplexek, amelyek az Arp2/3 komplexekek ativálását végzik. Az Arp2/3 elősegíti az aktin polimerizációt. Miután az apoptotikus sejtet körülölelik a pszeudopódiumok, azok fúziójával létrejönnek a fagoszómák. A fagoszóma létrejöttét elősegítő aktin struktúrák leválnak a membránról és megkezdődik a fagoszóma érési folyamata.

A fagoszóma érési folyamatának fő szabályozói a Rab fehérjék. A Rab fehérjék is GTPázok. A Rab5 a korai, míg a Rab 7 a kései fagoszóma érési folyamatának irányításáért felelős. A Rab5 funkciója elengedhetetlen a fagoszóma és korai endoszóma fúziójában. Az egyik kulcs effektora a korai endoszóma asszociált fehérje (EEA1). Az EEA1 foszfatidilinozitol 3-foszfáttal és a Rab5 fehérjével komplexet képezve elősegíti még több EEA1 toborzását az endoszómákhoz. Az EEA1 a vakuláris protein sorting (Vps) fehérjékkel interakcióba lépve egyrészt részt vesz a transzport folyamatokban, másrészt segíti a SNARE (szolubilis N-etil-maleimid-szenzitív faktor-kötő fehérje) fehérjék kapcsolódását az endoszómához, így elősegítve az edoszómák dokkolását. Ezen dokkolási folyamatoknak köszönhetően az endoszómák egymáshoz közel kerülve fuzionálnak, így multivezikuláris endoszómák jöhetnek létre. A korai endoszóma pH-ja közel semleges, körülbelül 6,3. A foszfatidilinozitol 3-foszfát a Rab5-tel és az EEA1-gyel elősegíti a fagoszóma érésében résztvevő számos fehérje toborzását és ezt követő aktiválását, beleértve a hepatocita növekedési faktor által szabályozott tirozin kináz szubsztrátot és a transzportkomplexhez szükséges endoszomális válogató komplexek egyéb komponenseit, valamint a Rab7-et, amely a késői endoszómák markere. Ahogyan az érés folyamata halad előre, a Rab5 mennyisége csökken és a Rab7 fehérje fogja irányítani az endoszómák lizoszómákkal való fúzióját, ezáltal a fagolizoszómák kialakulásának a folyamatát. A Rab7 effektor fehérjéje a Rab7-inerakciós lizoszómális fehérje (RILP), amely a dinein-dinaktin mikrotubulus-asszociált motor komplex-szel lép interakcióba. A komplex egyrészt a sejt belseje felé irányítja az enodszómákat, másrészt elősegíti a fagoszómális tubulusok endocitotikus kompartmentek felé nyúlását. A folyamat előrehaladásával a kései fagoszóma pH-ja a V-ATPázok segítségével, melyek protont pumpálnak a citoplazmából a fagoszóma lumenjébe, tovább csökken, körülbelül 4,5-5,5-ig. A lizoszómák körülbelül 70 hidrolítikus enzimet tartalmaznak, amelyek a makromolekulák

hidrolíziséért felelősek. Ilyen enzimek például a különféle savas proteázok lipázok, glikozidázok, nukleázok, foszfatázok és szulfatázok.

### 2.5. Az apoptotikus zsírsejtek fagocitózisa

A megfelelő makrofágok általi efferocitózis feltétele, hogy az elhalt sejt mérete, olyan legyen, hogy az kezelhető legyen a makrofág számára. Kisméretű sejtek, mint a timociták, megfelelnek ennek a méretnek, és akár apoptózissal, akár nekrózissal halnak el, közvetlenül felvevődnek a környező makrofágok által. A zsírsejtek mérete azonban olyan nagy, hogy az apoptózis biológiai folyamatában fel kell darabolódniuk apoptotikus testekre, hogy a lényegesen kisebb makrofágok fel tudják azokat venni. Laborunk korábbi vizsgálataiban *in vitro* vizualizálták a zsírsejtek apoptózisát és érdekes módon azt találták, hogy az elhaló zsírsejtek zsírtartalmukat extracelluláris vezikulákba csomagolják, és a makrofágok először ezt veszik fel. Majd, amikor a zsírtartalom nagy része felvételre kerül, aktiválódik a klasszikus apoptotikus program, és a sejt többi része apoptotikus testekké darabolódik, és így vevődik fel. Jól ismert, hogy szöveti metszeteken a makrofágok az elhaló zsírsejteket koronaszerűen körbe veszik, azaz egy nagy zsírsejt feldolgozásában párhuzamosan több makrofág vesz részt. Más laborok azt feltételezik, hogy a zsír felvétele lizoszomális exocitózissal történik, amikor is a makrofág lizoszóma membránja fúzionál a makrofág sejtmembránjával, a lizoszóma tartalma a makrofág és az adipocita közé kerül, és a lizoszomális enzimek bontják le a zsírsejteket. Vizuális adataink alapján mi inkább úgy gondoljuk, hogy a makrofágok ezeket a vezikulákat talán közvetlenül a lizoszómába veszik fel. Ennek bizonyítása laboratóriumunkban folyamatban van.

### 2.6. Mer tirozin kináz

A Tyro-3, Axl és a Mer a TAM receptor tirozin kináz családba tartozik. Számos szövetben és szervben a homeosztázis szabályozásáért felelősek. Működésük elengedhetetlen az immun-, reproduktív, a hematopoietikus, a vaszkuláris és az idegrendszer működésében. Mindhárman efferocitózis receptorok. A TAM receptorok ligandjaik (Protein S és Gas6) által csoportosíthatók. A Gas6 mindhárom TAM receptorhoz, míg a protein S csak a Tyro3 és Mer receptorokhoz képes kötődni. A TAM receptorokra jellemző, két doménnel rendelkeznek. Az extracelluláris domén két immunglobulin szerű doménből és két fibronektin III doménből áll, amelyek a ligandkötésben vesznek részt. Az intracelluláris domén a tirozin kináz domén, amely az autofoszforilációhoz szükséges, és amely extracelluláris stimuláció hatására, vagy anélkül is aktiválható.

Az Axl testszerte expresszálódik és részt vesz többek között a sejtprofilerációban, túlélésben, angiogenezisben és immunszuppresszióban. A Tyro3 a gasztrointesztinális, ideg- és reproduktív

rendszer fejlődése során magas expressziót mutat és részt vesz szintén a sejtproliferációban, túlélésben, tumorgenezisben, migrációban.

A Mer a szöveti és az M2 fenotípusú makrofágokban fejeződik ki. A szöveti homeosztázisban betöltött funkcióját bizonyítja, hogy a Mer jeltáviteli útvonala antiinflammatorikus hatással rendelkezik. A makrofágok M1-M2 polarizációja során fokozott mértékben fejeződik ki. A fokozott Mer expresszó hatására nő a GAS6 termelés, mely az antiinflammatorikus IL-10 mennyiségét fokozza. A Mer antiinflammatorikus hatása úgy is érvényesülhet, hogy gátolja a proinflammatorikus hatású TNFα (tumor nekrózis faktor α) termelését, ezáltal hozzájárulva a gyulladás csökkentéséhez.

A Mer számos tumor esetében magas expressziót mutat. Az antiinflammatorikus hatása miatt immunszupresszív tumor mikrokörnyezetet kialakítására képes nemcsak az antiinflammatorikus citokinek termelésének fokozásán keresztül, hanem az immunsejtek szabályozása által is. A Mer emiatt napjainkban a tumorok kezelésének egyik célpontja. A Mer célzott gátlása a csökkent efferocitózis által egyrészt lassítja a tumor növekedését, másrészt fokozza a tumorellenes immunsejtek szövetbe történő infiltrációját. A Mer továbbá hozzájárul a sérülést követő szöveti regeneráció elősegítéséhez is.

### 2.7. A metabolikus szindróma kialakulásának lépései és következményei

A zsírszövet nemcsak a lipid tárolására alkalmas, hanem endokrin funkciót is ellát. Az általa termelt legfontosabb adipokinek például az adiponektin, leptin, rezisztin szabályozó funkciót látnak el nemcsak a májban, hanem az izomban és az agyban is. Elhízásban ezen hormonok aránya felborul: az adiponektin termelése csökken, míg a leptin és a rezisztin termelődése fokozódik. A zsírtömeg gyors növekedése miatt a hipertrófiás zsírszövet vaszkularizációja nem alakul ki megfelelően, aminek következtében hipoxiás körülmények alakulnak ki. A hipoxia következményeként az adipociták elhalnak. Az adipociták sejthalála kaszpáz függő és független útvonalon is bekövetkezhet. Az extrinzik útvonal receptorai, mint a Fas, TNF-R1, TRAIL-R a halál ligandok által aktiválódnak. Ezek a receptorok olyan enzimkaszkádokat aktiválnak, amelyek proteolítikus enzimeket, főként kaszpázokat tartalmaznak. Az intrinzik útvonal aktiválását a sejtorganellumokat érő stressz, mint például az endoplazmatikus retikulum stressz aktiválja. Olyan pro-apoptotikus fehérjék aktiválódnak, mint a Bid vagy a Bax, amelyek segítségével számos egyéb pro-apoptotikus fehérje szabadul ki a mitokondriumból, melyek többek között az apoptózist indító apoptoszóma kialakításában vesznek részt.

Normál körülmények között a zsírszövetben számos immunsejtet találhatunk: eozinofil és neutrofil granulociták, amelyek által szekretált citokinek antiinflammatorikus környezetet biztosítanak a zsírszövetben. Elhízás során a fokozott zsírszöveti sejthalál következtében a vérpályából a

zsírszövetbe kilépő makrofágok M1 (proinflammatorikus) irányban differenciálódnak és fokozzák a gyulladásos környezet kialakulását.

Az adipociták a nemcsak a lipázok által képesek a zsírsavak kibocsátására, hanem exoszóma méretű lipiddel teli vezikulák által is, melyeket a makrofágok képesek felvenni. Az elhízás következtében teljes mértékben általalakul a zsírszövet dinamikája, megváltozik a zsírszövet és lipid turnover, így a zsír tárolása a derék és csípő környékén kívül megjelenik a májban és az izmokban is. Ezen tényezők mind hozzájárulnak a metabolikus szindróma kialakulásához.

Egyre több kutatás támasztja alá azt a feltételezést, hogy az elhízáshoz kapcsolódó patológiás történések (metabolikus szindróma) kialakulásában a zsírszöveti makrofágoknak meghatározó szerepe van. Így, ha vagy depletálják a makrofágokat, vagy genetikusan kiütik a makrofágok kivándorlását meghatározóan szabályozó MCP-1 fehérjét, akkor mind a zsírmáj, mind az inzulin rezisztencia kialakulása megakadályozható.

A metabolikus szindróma a modern világ egyik krónikus, nem fertőző betegsége. Az elhízáshoz kapcsolódó metabolikus szindróma alatt az olyan metabolikus zavarok összességét értjük, amely magába foglalja az inzulinrezisztenciát, a diszlipidémiát (kóros zsíranyagcsere elváltozások, amely a vér megnövekedett lipidtartalmát eredményezi), a deréktáji elhízást és a magas vérnyomást. A metabolikus szindróma nagy mértékben összefüggésbe hozható a 2-es típusú diabétesz kialakulásával és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásával is.

Az elhízás során az energiabevitel fokozott, amely azt eredményezi, hogy olyan mechanizmusok aktiválódnak, amelyek megakadályozzák a sejtekben az energia felhalmozódását. Ennek egyik módja a sejtek inzulin érzékenységének a csökkenése, amely inzulinrezisztencia kialakulásához vezet. Mivel a zsírszövet képes befolyásolni az egész test inzulin érzékenységét, elhízásban nagyon gyakori az inzulin rezisztencia kialakulása. Ez egy részben a zsírszövetből felszabaduló gyulladásos citokinek, mint például a TNFα és IL-6-nak köszönhető. Ezen citokinek többféle útvonalon gátolhatják az inzulin jelátviteli útvonalat. Az egyik az inzulin- receptor szubsztrát (IRS-1) 1 szerin/treonin foszforilációja, amely negatívan szabályozza az inzulin receptor jelátviteli útvonalát. Másik lehetséges útvonal a PPARγ funkciójának gátlása. Mivel a PPARγ fokozza a lipogenezisben és a lipid tárolásában résztvevő gének expresszióját, gátlása hozzájárul az inzulinrezisztencia kialakulásához. A vérplazma megnövekedett FFA tartalma a lipolízis fokozódása és a triglicerid szintézis által szintén hozzájárul az inzulinrezisztencia kialakulásához.

Inzulinrezisztencia kialakulhat az adiponektin csökkent szintje következtében is. Az adiponektint főként az adipociták szekretálják és hozzájárul az inzulin-érzékenység fokozásához a sejtekben, a zsírsavak oxidációjához, illetve a gyulladás csökkentéséhez is. Az adiponektin szintek inverz korrelációt mutatnak az elhízás mértékével és a csökkent szintje hozzájárul az elhízás következtében létrejövő inzulinrezisztencia kialakulásához. Másik fontos inzulinérzékenységet

szabályozó adipokin a rezisztin. Bár először az adipocitákban került felfedezésre, mára már kimutatták, hogy a mononukleáris leukociákban, makrofágokban, lép és csontvelői sejtekben is szignifikáns mértékben expresszálódik. A magas rezisztin szintek hozzájárulnak mind az inzulinrezisztencia, mind a gyulladás kialakulásához a rezisztin proinflammatorikus hatása miatt.

Az elhízás gyakori kísérője a nem alkoholos zsírmáj (NAFLD), melynek globális prevalenciája 25%. A NAFLD a cirrózis (májzsugor) és a hepatocelluláris karcinóma fő okozója. Az NAFLD legfőképpen a metabolikus szindrómához köthető állapotok következtében alakul. Az NAFLD a májban a trigliceridek felhalmozódásával írható le. A fő metabolikus szubsztrátok, melyekből a trigliceridek képződnek lehetnek az étrenddel bevitt nagy mennyiségű zsírok, illetve a fruktóz és a glükóz. Egyik oldalról a táplálékkal a szervezetbe juttatott felesleges zsír tárolása a zsírszövetben kerül tárolásra. Az adipocita zsírraktárak növekedése azt eredményezi, hogy az éhezési szakaszokban glükagon hatására több zsírsav szabadul fel a hormonszenzitív-lipáz hatására. Ugyanakkor a zsírszöveti makrofágok zsírsav égető kapacitása is telítődik, így az extracelluláris vezikulumokban kikerülő zsírt már nem képesek a zsírsejtektől átvenni. A felszabaduló zsírok ezért a hasi zsírsejtekből a keringési viszonyok miatt és a májba szállítódnak és lerakódnak. A másik oldalt tekintve, amennyiben nagy mennyiségű glükóz és fruktóz kerül bevitelre, akkor több enzimatikus lépésen keresztül azok zsírsavakká alakulnak (de novo lipogenezis). Ezeknek a zsírsavaknak egy részét a máj oxidálhatja, vagy trigliceriddé alakítva nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) formájában a vérbe juttatja hiperlipidémiát idézve elő. Azonban nagy szubsztrát terhelés hatására ezen útvonalak sem működnek megfelelően, amely lipotoxikus lipidek képződéséhez vezet, mint például a diacilglicerol, ceramid, amelyek hozzájárulnak a májszövetet károsító folyamatokhoz.

Az elhízás okozta magas vérnyomás kialakulása egy nagyon komplex folyamat, amely magában foglalja a szimpatikus idegrendszer túlzott aktivitását, a renin-anginotenzin-aldoszteron rendszer stimulációját, a zsírszövet által termelt citokinek mennyiségének változását, az inzulinrezisztenciát, végül a vesefunkció megváltozását. Az adipociták általi csökkent adiponektin termelés csökkent inzulinérzékenység kialakulásához, illetve a fokozott proinflammatorikus citokintermelés valamint a szabad zsírsavak gyulladáshoz vezetnek. Ezen folyamatok az endoteliális diszfunkcióhoz vezetnek, amely által fokozódik az artériák merevsége. Az adipociták általi fokozott leptin termelés az idegrendszeren keresztül fokozza a nátrium reabszorbcióját, továbbá az FFA-k által fokozódik a vese terhelése, amely szintén hozzájárul a magas vérnyomás kialakulásához.

## 2.8. Az ER stressz és az autofágia kapcsolata

A szabad elsősorban telített zsírsavszint emelkedése a vérpályában sokban hozzájárul a szervek (elsősorban nem zsírsejtek) diszfunkciójához vagy károsodásához azáltal, hogy a zsírsejteken kívül is lipid felhamozódást eredményez. A folyamatot lipotoxicitásnak nevezzük. A nem megfelelően feltekert fehérjék felhalmozódása endoplazmatikus stresszhez vezetve meghatározó szerepet játszik a lipotoxicitás során a sejtkárosító folyamatok aktiválódásában. A sejt próbálja korrigálni a hibát, és a nem megfelelően tekeredett fehérjék visszatekerésén kívül, próbál megszabadulni a hibás fehérjéktől az autofágia folyamatának aktiválásán keresztül.

## 2.9. A gyulladás és a csökkent efferocitózis kapcsolata

Elhízott egyénekben megfigyelhető magas telített zsírsav szint gátolja a szervezet bármely területén a makrofágok efferocitózis képességét. A csökkent efferocitózis számos mechanizmuson keresztül vezethet krónikus gyulladások kialakulásához. A magas zsírsavszint hatására általánosan romló efferocitózis program hajlamosít mindenféle gyulladásos betegség, mint ateroszklerózis, oszteoartritisz, asztma, krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), apikális periodontitisz kialakulására elhízott egyénekben. Hogy melyik szövetben jön létre gyulladás, azt egyéb genetikai vagy külső tényezők, pl. dohányzás, magas koleszterinszint határozza meg. Ebben a fejezetben ezen mechanizmusokat néhány példán keresztül szeretném szemléltetni.

Az ateroszklerózist az endotél aktiváció indítja el, amelyet követ a lipidek felhalmozódása, kalcifikáció, amely nemcsak érszűkületet okoz, hanem a gyulladásos útvonalakat is aktiválja. A makrofágok efferocitózis képessége az ateroszklerotikus léziókban nagymértékben csökken, így az el nem takarított apoptotikus sejtek nekrózison mennek keresztül, amely egyrészt gyulladást okoz, másrészt egy úgynevezett nekrotikus mag jön létre, amely a képződött plakk leválását okozhatja, ezáltal trombózist előidézve.

Az oszteoartritisz egy gyakori, krónikus degeneratív ízületet érintő betegség, melynek kialakulásában az elhízás szignifikáns rizikófaktornak számít. Egy tanulmány szerint elhízott egerekben fokozott volt az ízületi porcok sérülése és a szinoviális apoptotikus sejtek száma. A szövetekbe infiltrálódó M1 makrofágok kevesebb Gas6-ot szekretáltak, ezért csökkent az efferocitózis is. Emellett a makrofágok fokozott mértékben termeltek gyulladásos citokineket. Az ízületekbe adott Gas6 injekció segítségével sikeresen vissza tudták állítani a makrofágok efferocitózisát, ezáltal sikerült megelőzni az elhízással társult oszteoartritisz kialakulását.

Az asztma olyan megbetegedés, amelyben a szervezet nem megfelelő immunválaszt ad a belélegzett allergénekre. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a légúti makrofágok efferocitózisának

csökkenése hajlamosít légúti gyulladások kialakulására, és az asztmás betegek jelentős részében kimutatható a légúti makrofágok csökkent efferocitózis képessége.

A COPD kialakulásának oka az ártalmas részecskék, főként dohány és pollenek belélegzése. A COPD következménye a krónikus bronchitis, illetve a tüdőtágulat, melyek a légutak szűkületéhez és légszomjhoz vezet. A bazális hámsejtek fontos szerepet töltenek be a védelemben, és a sérülést követő remodellingben. A belélegzett részecskék által, a sejtek átprogramozásának következményeként, a légutak laphámsejtjeiben metaplázia, a kehelysejtekben hiperplázia alakul ki, illetve ciliáris diszfunkció jön létre, továbbá fokozódik a nyálkatermelés, ezáltal egy lokális gyulladásra és fertőzésre hajlamos környezet alakul ki a tüdőben.

Az apikális periodontitisz a foggyökér körül kialakuló gyulladás, melyet bakteriális fertőzés okoz. Egy tanulmány szerint, melyben az efferocitózis és az apikális periodontitisz közötti kapcsolatot vizsgálták. ARA290 (amely egy gyulladáscsökkentő peptid) kezelés egyrészt fokozta a makrofágok efferocitózisát, másrészt az M2 makrofág polarizáció által csökkentette a gyulladást, ezáltal megszüntetve az apikális periodontitiszt.

# 3. CÉLKITŰZÉSEK

**I.** A rendelkezésre álló szakirodalmi források alapján elhízásban a zsírsejtek fokozott elhalása és a belőlük felszabaduló zsír makrofágok általi nem elégséges eltakarítása meghatározó szerepet tölt be az elhízáshoz kapcsolódó krónikus alacsony fokú gyulladás, illetve a lipotoxicitással jellemezhető patológiás folyamatok kialakulásában. Elhízás során emelkedik a vérben keringő telített zsírsavak koncentrációja is, amelyről kimutatták, hogy gátolja a perifériás makrofágok efferocitózis képességét. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a palmitát milyen mechanizmusokon keresztül hat a makrofágok efferocitózis folyamatára.

**II.** Ismert, hogy a Mer tirozin-kináz fontos eleme az efferocitózis folyamatának. Kísérleteinkben Mer-/- egereket alkalmazva az elhalt sejtek eltakarításának zavarát modelleztük. Ezen modell segítségével azt vizsgáltuk, hogy az elhalt sejtek eltakarításának zavara a Mer hiányának következtében fokozhatja-e a metabolikus szindróma kialakulását magas zsírtartalmú diétán tartott egerekben.

# 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 4.1. Reagensek, vegyszerek

A reagensek és vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől szereztük be, amennyiben nem, azt külön jeleztem.

## 4.2. Kísérleti állatok

A kísérletek egy részéhez 4 hetes, illetve 2-4 hónapos C57BL/6 egereket használtunk. Az etetéses kísérletek során a 8 hetes Mer-/- és a vad típusú testvéreiket külön ketrecekben tartottuk. A Mer tirozin kináz hiányos egerekre teljes testes Mer hiány jellemző, amelyet Cre-loxP módszer alkalmazásával hoztak létre. Mind a Mer-/-, mind a vad típusú egereket két részre osztottuk: a HFD csoportokat magas szukróz és magas zsírtartalmú étrenden (45% kcal% zsír, 17% kcal% szukróz; Research Diets Inc., D12451), míg az kontroll csoportokat (ND) normál diétán (13% kcal% zsír; 4.6% kcal% szukróz; Special Diets Services, VRF1 (P)) tartottuk. Az állatokat 12 órás periódusokban váltakozó sötét/világos helyen tartottuk, ad libidum etettük és itattuk őket. A bevitt táplálék mennyisége, illetve az egerek tömege hetente regisztrálásra került. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (az engedélyek száma: 7/2016/DEMÁB, illetve 7/2021/DEMÁB) hagyta jóvá.

## 4.3. Csontvelő-eredetű makrofágok (BMDM-ek) izolálása és kezelése

2-4 hónapos C57BL/6 egerek izofluránnal történő túlaltatását követően a csontvelői progenitor sejteket fiziológiás sóoldattal történő kimosásával nyertük ki a combcsontokból. A sejteket 5 napon keresztül differenciáltattuk DMEM tápfolyadékban (10% FBS, 20% L929 fibroblaszt sejtvonalról származó felülúszó [M-CSF forrásként], 2mM L-glutamin, 100U/ml penicillin, 100µg/ml sztreptomicin), 37 °C-os termosztátban, 5%-os CO2 jelenlétében. Az úszó sejteket a 3. napon lemostuk és az említett tápfolyadékot adtuk a letapadt differenciálódó sejtekhez. A 6. napon a sejteket 24 órán keresztül kezeltük különböző koncentrációjú BSA-val, 0,4mM BSA-val konjugált palmitáttal önmagában, illetve az AMP-aktivált protein kináz enzim aktivátorával 0,5mM 5-aminoimidazol-4-karboxamid-1-β-D-ribofuranoziddal (AICAR), az mTORC1 komplex specifikus inhibitorával 100nM rapamycinnel, a ROCK inhibitor 30µM Y-27632, illetve a pan-kaszpáz inhibitor 50µM Z-VAD-FMK-val együtt. A nátrium-palmitát készítéséhez 100mM törzsoldatot 150mM NaCl-ban hígítottunk, majd

10%-os zsírsavmentes, alacsony endotoxintartalmú BSA-hoz (pH 7,4-re állítva) adtuk 1:6 arányban, így 4mM palmitát-BSA törzsoldatot kaptunk, amelyet használat előtt 0,22µm-es, alacsony fehérjekötő kapacitással rendelkező szűrőn szűrtünk át.

### 4.4. Apoptotikus timociták létrehozása *in vitro*

Az apoptotikus timocitákat 4 hetes C57BL/6 egerek csecsemőmirigyéből kinyert timocitákból, széruméheztetéssel hoztuk létre. A tímusz eltávolítását követően steril fém szűrőn átpréseltük, a sejteket PBS-sel mostuk, majd RPMI 1640 tápfolyadékban (2mM L-glutamin, 100U/ml penicillin/100 µg/ml sztreptomicin 24 órán keresztül inkubáltuk (37°C, 5% CO2).

### 4.5. A sejtek életképességének vizsgálata

A hatodik naptól a BMDM-eket különböző koncentrációjú BSA konjugált palmitát jelenlétében tenyésztettük 24 órán keresztül. Ezt követően a sejteket 10µl Cell Counting Kit-8 reagenssel kezeltük 1 órán keresztül 37°C-on, sötétben. Az abszorbanciát 450nm-en mértük BioTek mikroplate olvasóval (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### 4.6. Efferocitózis vizsgálatok

Az apoptotikus timocitákat 2,5µM Cell Tracker DeepRed fluoreszcens festékkel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubáltuk 24 órán keresztül. Ezt követően az apoptotikus sejteket $2x10^5$ BMDM-hez adtuk 1:5 arányban és 40 percen keresztül inkubáltuk együtt a sejteket. Az inkubációt követően a nem fagocitált jelölt apoptotikus sejteket mosással eltávolítottuk, majd a BMDM-eket tripszines kezelést követően összegyűjtöttük. A sejtek fluoreszcenciáját Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométerrel analizáltuk. A BMDM populációt méretük és denzitometráltságuk alapján választottuk ki (SSC/FSC) és ezen populáción belül az FL2 és FL4 csatornákban detektálva határoztuk meg a fluoreszcens jel alapján azoknak a BMDM-eknek a százalékos arányát, amelyek elhalt sejteket fagocitáltak.

### 4.7. Fluoreszcens mikroszkópia

A BMDM-eket 5µM karboxilfluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észterrel (CFDA-SE), az apoptotikus timocitákat 2,5µM Cell Tracker DeepRed fluoreszcens festékkel inkubáltuk 24 órán

keresztül. Ezt követően a BMDM-eket és az apoptotikus sejteket 1:5 arányban, 40 percen keresztül inkubáltuk együtt. Az elhalt sejteket mosással eltávolítottuk, majd a BMDM-eket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejtekről fluoreszcens mikroszkóppal (4471136, FLoidTM Cell Imaging station) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) felvételeket készítettünk.

### 4.8. Western blot analízis

Hogy hozzájussunk a sejtek teljes fehérjetartalmához, a sejteket hideg proteázgátló koktélt tartalmazó lízis pufferrel tártuk fel. A minták fehérjetartalmát Bio-Rad Protein Assay festékkel (Bio-Rad, Budapest, Magyarország) határoztuk meg. Ezt követően a mintákat SDS-mintapufferben forraltuk 10 percig 100°C-on. A mintákat 12%-os poliakrilamid gélen futtattuk, majd immobilion-P polivinilidén-fluorid membrára (Bio-Rad) transzferáltuk Bio-Rad félszáraz blottolóval. A membránt 1 órán keresztül blokkoltuk szobahőmérsékleten 5% BSA-t vagy 5% tejport tartalmazó TBST pufferrel. A membránokat 4°C-on, egy éjszakán keresztül reagáltattuk egér p70 S6 kináz (Cell Signaling Technology, Inc.), P-p70 S6 kináz (T389) (Cell Signaling Technology, Inc.), Akt (pan) (Cell Signaling Technology, Inc.), P-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technology, Inc.), miozin-foszfatáz regulátor alegység 1 (MYPT1) (ThermoFisher), P-MYPT1 (ThermoFisher), Rock1 (MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA, AMPKα (Cell Signaling Technology, Inc.) vagy P-AMPKα (Thr172) (Cell Signaling Technology, Inc.) ellenes antitestekkel, valamint monoklonális β-aktin ellenes antitestekkel (A5441). Ezt követően a membránokat TBST pufferrel mostuk, majd szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk HRP konjugált egér IgG vagy kecske nyúl IgG(H+L) ellenes másodlagos antitestekkel. A fehérjéket kemilumineszcencia segítségével detektáltuk Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Advansta Inc., San Jose, CA, USA) segítségével. A sávok pixelsűrűségét ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

### 4.9. Rac1, CDC42, RhoA aktivitás meghatározása

A meghatározáshoz mintánként $2{,}8 \times 10^6$ BMDM-et használtunk. A BMDM-ek kezelését követően a gyártó utasításai alapján a sejteket összegyűjtöttük, és G-LISA Rac1, CDC42 és RhoA aktivációs assay kitet (Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA) használva határoztuk meg ezen G-fehérjék aktivitásának a mértékét.

### 4.10. A makrofágok megfestése konfokális lézer pásztázó mikroszkópiához

A BMDM-eket µ-Slide 8 Well ibiTreat lemezeken tenyésztettük és 50nM LysoTrackerTM Green DND-26 (Invitrogen) fluoreszcens festékkel 1 órán keresztül festettük meg. Az apoptotikus timocitákat 2,5µM Cell Tracker DeepRed fluoreszcens festékkel (Invitrogen) inkubáltuk 24 órán keresztül. Ezt követően az efferocitózis vizsgálatoknál ismertetett módon apoptotikus sejteket $6x10^4$ BMDM-hez adtuk 1:5 arányban és 40 percen keresztül inkubáltuk a sejteket. Inkubációt követően a nem fagocitált jelölt apoptotikus sejteket mosással eltávolítottuk. A sejtek fixálása nélkül konfokális felvételeket készítettünk.

### 4.11. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A fluoreszcens képek Nikon A1 Eclipse Ti2 konfokális lézerszkennerrel készültek (Nikon, Tokió, Japán) Plan Apo 60 vízobjektív segítségével [NA = 1,27]. A LysoTracker™ Green DND-26 és a CellTracker™ Deep Red Dye gerjesztését 488nm-es és 647nm-es lézerrel végeztük. A fluoreszcens emissziót 500-550nm, illetve 660-740nm-es sávszűrők segítségével detektáltuk. Képek körülbelül 1µm vastag optikai szakaszok, amelyek mindegyike 512x512 pixelt tartalmaz, 100 vagy 410nm pixelmérettel. A felvételeket 2,2µs pixel tartózkodási idővel készítettük. A képek szekvenciális módban készültek, hogy elkerüljük a csatornák közötti zavaró átfedéseket.

### 4.12. Csontvelő-transzplantáció

A recipiens Mer-/- és Mer+/+ egereket (7 hetes, hím) Theratron 780C kobaltágyú alkalmazásával 11 Gy sugárzásnak tettük ki. Az egereket kör alakú ketrecbe (mouse pie cage) helyeztük, amelyben 11 egér fér el. A besugárzást követően a recipiens egerekbe Mer+/+ és Mer-/- típusú donor egerek combcsontjából, sípcsontjából és felkarcsontjából kimosott, izolált csontvelői sejteket retro-orbitális injekcióval juttattuk be ($20x10^6$ sejt/egér).

### 4.13. Szövetminták begyűjtése

Az etetési szakasz végén az egereket izoflurránnal túlaltattuk, és megmértük a testtömegüket, testhosszukat, meghatároztuk a testtömeg indexüket, illetve máj, és gonadális fehér zsírszövet (gWAT) mintákat gyűjtöttünk további elemzések céljából. A zsírszövet- és májmintákat 4%-os paraformaldehidben fixáltuk szövettani vizsgálathoz, míg a génexpressziós vizsgálatokhoz és máj

triglicerid meghatározáshoz szükséges mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

### 4.14. Adipociták és zsírszöveti makrofágok izolálása

A zsírszövetet mosást követően transzportpufferbe helyeztük (DMEM + 1% penicillin-sztreptomicin) oldattal és 1% BSA-val. A szövetet finomra aprítottuk, 30-60 percig 37 °C-on emésztettük 20g/l BSA-t és 0,5g/l 1-es típusú kollagenázt, HEPES puffert (pH 7,4) tartalmazó emésztőoldatban, majd 100µm-es nylonszűrőn átszűrtük. Ezt követően a mintákat centifugáltuk, az adipocitákat összegyűjtöttük és -80°C-on tároltuk az RNS izolálásáig. A zsírszöveti makrofágok izolálása során a vörösvértesteket hemolízissel távolítottuk el (ACK Lysing Buffer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) és a sztrómális vaszkuláris sejtfrakciót újraszuszpendáltuk festőpufferben (PBS 0,5% BSA-val és 2mM EDTA-val). A zsírszöveti makrofágokat MACS (mágneses sejtszeparálás) segítségével izoláltuk a stróma vaszkuláris sejtfrakcióból F4/80 pozitív szelekcióval a gyártó utasítása alapján (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország).

### 4.15. Triglicerid koncentráció meghatározása a májban

A triglicerid koncentrációjának meghatározását elszappanosított, neutralizált májkivonatban végeztük (a májmintákat egy éjszakán keresztül 55°C-on emésztettük kálium-hidroxidban) enzimatikus glicerol assay segítségével a gyártó utasítása alapján (Free Gycerol reagent. Gycerol Standard Solution, F6428, G7793).

### 4.16. Hisztológia

A máj és zsírszöveti mintákat 4%-os formaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyaztuk. A paraffinmetszeteket hematoxilin-eozin festéssel megfestettük. A metszeteket EVOSTM XL Core Imaging System alkalmazás segítségével analizáltuk (Thermo Fisher Scientific). A zsírszöveti képek kiértékeléséhez az ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) alkalmazást használtuk.

### 4.17. RNS izolálás és valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A minták totál RNS izolálását TRI reagenssel (Thermo Fisher Scientific) végeztük a gyártó utasítása alapján. A totál RNS-t reverz traszkripció segítségével cDNS-sé írtuk át High Capacity

cDNA reverse Transcription Kit (Life Technologies, Budapest, Magyarország) segítségével a gyártó utasítása alapján. A génexpresszió mértékének meghatározását qRT-PCR-ral végeztük triplikátumokban FAM-MGB-vel jelölt próbák (Life Technologies) segítségével Roche LightCycler LC480 valós idejű PCR műszerrel. A mRNS relatív szintjét összehasonlító CT (ΔΔCt) módszerrel számoltuk ki. Az expressziós értékek normalizáláshoz a GAPDH háztartási gént használtuk.

### 4.18. Inzulinrezisztencia teszt és szérum inzulin meghatározása

Az inzulinrezisztencia teszt kivitelezésére a 17. héten került sor. 6 órás éheztetést követően 0,75 IU/ttkg inzulint (ACTRAPID Penfill 100IU/ml) (Novo Nordisk, Koppenhága, Dánia) injektáltunk intraperitoneálisan. Az inzulin beadását követően a vér glükóz koncentrációját meghatározott időpontokban DCont Trend vércukormérő készülék (DCont, Budapest, Hungary) segítségével mértük meg. A plazma inzulinszintjét egér inzulin ELISA 80-INSMS-E01 kit (ALPCO, Salem, NH, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó utasítási alapján.

### 4.19. Statisztikai analízis

Az adatokat minden esetben ±SD középértékként vagy egyéni értékként tüntettük fel. Minden statisztikai analízist GraphPad Prism 6.01 szoftverrel végeztünk. A $p<0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A BMDM-ekkel végzett kísérletek során két csoport közötti különbség megállapításához kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student t-próbát, míg 2-nél több csoport összehasonlítása esetén egy utas ANOVA-t használtunk Tukey-féle többszörös analízissel. A Mer hiányát vizsgáló kísérletekben négy vagy hat csoport összehasonlítása esetén egy utas ANOVA-t (Sidak többszörös analízissel). Két független faktorral elkülönített adatsorok esetében két utas ANOVA elemzést használtunk (Tukey-féle többszörös analízissel).

# 5. EREDMÉNYEK

## 5.1. A palmität BMDM-ek efferocitózisára gyakorolt gátló hatásának mechanizmusa

### 5.1.1. A palmität gátolja a BMDM-ekben az apoptotikus sejtek fagocitózisát anélkül, hogy hatással lenne a fagocitózishoz köthető receptorok mRNS expressziójára

Hogy teszteljük, a palmität valóban gátolja a BMDM-ek efferocitózisát a BMDM-eket különböző koncentrációjú palmitátnak tettük ki 24 órán keresztül. Ezt követően a BMDM-ekhez apoptotikus timocitákat adtunk 40 percen keresztül, majd meghatároztuk a makrofágok fagocitáló kapacitását. Azt találtuk, hogy a palmität a BMDM-ek efferocitózisát dózis függő módon gátolja. Korábban kimutatták, hogy a palmität ER stresszt indukálva fokozza a makrofágok sejthalálát. Ahhoz, hogy eldöntsük, hogy esetünkben a csökkent efferocitózist a BMDM-ek palmität kezelés hatására bekövetkező apoptózisa okozza-e, a BMDM-eket különböző koncentrációjú palmitáttal kezeltük, majd megvizsgáltuk a BMDM-ek életképességét. Azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt palmität koncentrációk nem befolyásolták a BMDM-ek életképességét. Hogy az előző kísérletünket megerősítsük a BDMD-eket pan-kaszpáz apoptózis inhibitorral kezeltük. Az apoptózis gátlása a BMDM-ekben nem fokozta a palmität által gátolt fagocitózist. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a BMDM-ek fagocitikus kapacitásának a csökkenése nem a BMDM-ek palmität indukálta sejthalálával van összefüggésben. A legmegfelelőbb palmität koncentrációnak a 0,4mM-t találtuk, mivel ezen koncentráció szignifikánsan csökkentette a fagocitózist, azonban a BMDM-ek életképességét nem befolyásolta, így a további kísérleteinkben ezt a koncentrációt használtuk.

Mivel a fagociózis kulcslépése az apoptotikus sejtek fagocita receptorok általi felismerése, a következő kísérletünkben azt szerettük volna megtudni, hogy a palmität kifejtheti-e az efferocitózist csökkentő hatását oly módon, hogy befolyásolja a fagocitózisban résztvevő kulcsmolekulák mRNS expresszióját. A palmität nem befolyásolta szignifikánsan az apoptotikus sejtek felvételében szerepet játszó receptorok mRNS expresszióját a zsírsavak felvételében is szerepet játszó játszó receptorok mRNS expresszióját a zsírsavak felvételében is szerepet játszó CD36 kivételével, melynek kifejeződése szignifikánsan növekedett.

### 5.1.2. A palmitát az energiaérzékelésen keresztül befolyásolhatja az efferocitózist a BMDM-ekben

A nagy mennyiségű palmitát felvételével nagy mennyiségű energia jut a BMDM-ekbe. Az AMPK meghatározó szerepet tölt be a sejtek energiaérzékelésében, aktivitása a sejtek energiaállapotától függ. Amikor a sejtek számára elegendő tápanyag áll rendelkezésre, akkor aktivitása gátolva van, azonban, ha a sejteknek nem áll rendelkezésre elegendő tápanyag, akkor az AMPK aktivitása nő. Az AMPK maximális aktivitásához a kináz domén treonin 172 foszforilációja szükséges. Mivel a palmitát nem a fagocitózisban résztvevő receptorokon keresztül fejti ki gátló hatását ezért megvizsgáltuk, hogy a palmitát kezelés hogyan befolyásolja az energiaérzékelő útvonalak aktivitását. A Western blot kísérletek adatai azt mutatták, hogy palmitát kezelés hatására csökkent a BMDM-ekben az AMPK enzim aktivitása. Hogy vizsgáljuk, van-e a palmitát által bevitt energiatöbbletnek hatása az efferocitózisra, a BMDM-ekben az alacsony energiaszinthez hasonló körülményeket teremtettünk oly módon, hogy a palmitáttal kezelt BMDM-ekhez a kezelés utolsó 1,5 órájában AICAR-t (5-aminoimidazol-4-karboxamid-1-β-D-ribofuranozid), egy AMPK aktivátort adtunk. Eredményeink azt mutatták, hogy az AMPK AICAR általi aktiválása képes volt ellensúlyozni a palmitát fagocitózisra gyakorolt gátló hatását.

### 5.1.3. A palmitát kezelés fokozza az mTORC1 aktivitást a BMDM-ekben

Az AMPK-ról ismert, hogy képes gátolni az emlős rapamycin célpont (mTOR) fehérje aktivitását. Mivel a palmitát kezelés csökkentette az AMPK aktivitást, ezért szerettük volna meghatározni, hogy palmitát kezelés hatására változik-e a BMDM-ekben az mTOR aktivitása. Az mTOR fehérje két komplexben is jelen van. Western blot segítségével meghatároztuk a protein S6 kináz treonin 389 foszforiláltsági szintjét. A protein S6 kináz az mTORC1 útvonal szubsztrátja, így a fokozott foszforiláltsága fokozott mTORC1 aktivitást jelez. Az Akt fehérje szerin 473 foszforilációja ugyanakkor fokozott mTORC2 aktivitást jelez. Kísérleteink azt mutatták, hogy a palmitát fokozza az mTORC1 aktivitását, de az mTORC2 aktivitására nincs szignifikáns hatással. Hogy megtudjuk, az mTORC1 aktivációja részt vesz-e az palmitáthoz köthető efferocitózis gátlásában, a BMDM-eket rapamycinnel, egy szelektív mTORC1 inhibitorral kezeltük. A rapamycint 100nM-os koncentrációban alkalmazva teljes mértékben gátolta a protein S6 kináz foszforilációját, azonban az Akt foszforilációjára nem volt hatással igazolva szelektív mTORC1-re gyakorolt hatását. A rapamycin kezelés ugyanebben a koncentrációban szignifikánsan ellensúlyozta a palmitát gátló hatását. Összefoglalva az eredményeket elmondhatjuk, hogy a palmitát fokozza a makrofágokban az mTORC1

aktivitását, az mTORC1 rapamycinnel történő gátlása pedig felfüggeszti a palmitát efferocitózisra gyakorolt negatív hatását.

### 5.1.4. A palmitát a BMDM-ekben fokozza az mTORC1 függő Rho kináz aktivációt, ezáltal gátolva az efferocitózist

A G fehérjék fontos szerepet töltenek be a citoszkeleton átrendeződésében a fagocitózis folyamata során. Mivel a palmitát nem befolyásolta a fagocitózisban résztvevő receptorok mRNS expresszióját úgy gondoltuk, hogy hatással lehet a G fehérjék aktivitására. 24 órás palmitát kezelést követően megvizsgáltuk a makrofágokban a Rac1, a CDC42 és a RhoA aktivitását. A Rac1 és a CDC42 esetében nem változott szignifikánsan az aktivitás, azonban RhoA esetében nőtt, és mTORC1 függő RhoA aktivitás szabályozást figyeltünk meg.

Mivel ismert, hogy a RhoA a RhoA-asszociált protein kináz 1 (ROCK1) fehérje szabályozásán keresztül részt vesz az efferocitózis negatív szabályozásában, megvizsgáltuk, hogy a palmitát, a rapamycin, vagy a palmitát és rapamycin kezelés befolyásolja-e a ROCK1 fehérje kifejeződését. Western blottal technikát alkalmazva egyik kezelés esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást a fehérje expressziójában.

A citoszkeleton átrendeződése során a ROCK1 fehérje egyik szubsztrátja a MYPT-1 fehérje, amelyet a treonin 850 foszforilációján keresztül aktivál. Western blot segítségével meghatároztuk a foszforilált MYPT1 fehérje szintjeit. Palmitát hatására a makrofágokban szignifikánsan nőtt a foszforilált MYPT1 fehérje mennyisége. Ugyanakkor rapamycin kezelés hatására még palmitát együttes jelenlétében is szignifikáns csökkenést figyeltünk meg. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az mTORC1 képes aktiválni a RhoA fehérjét, a RhoA fehérjén keresztül pedig a ROCK1 fehérjét.

Úgy véltük, hogyha a ROCK1 fehérje aktiválása részt vesz a palmitát efferocitózisra gyakorolt gátló hatásában, úgy a ROCK1 fehérje gátlásával képesek leszünk a palmitát negatív hatását visszafordítani, ezáltal fokozni a BMDM-ek efferocitózisát. Eredményeink valóban azt mutatták, hogy ha gátoltuk a ROCK1-et az Y-27632 inhibitorral, akkor a palmitát efferocitózisra gyakorolt gátló hatását meg tudtuk szüntetni.

### 5.1.5. A palmitát fokozza BMDM-ekben az autofágiát, de gátolja az autofágiás vakuólumok és a lizoszómák fúzióját

Ismert, hogy a palmitát képes a sejtekben ER stresszt indukálni és az ER stresszre adott egyik sejtválasz az autofágia számos más válasz mellett, mint például a kibontott fehérje válasz, vagy a mitokondriális működés megváltozása. Az autofágia aktiváció kimutatásának egyik lehetősége az LC3-II fehérje megnövekedett mennyisége, amely a fehérjének az autofágia során az ATG fehérjék általi poszttranszlációs módosításának következménye. A p62 fehérje szintén fontos szerepet tölt be az autofágia során a lebomló molekulák megjelölésében. A p62 a hozzá kapcsolt fehérjékkel együtt lebomlik a lizoszómában, így mennyiségének csökkenése fontos indikátora az autofágia mértékének. Az mTORC1-ről ismert, hogy gátolja az autofágiát, így palmitát általi gátlását követően azt várnánk, hogy az autofágiás folyamatok gátlódnak. Azonban az ER stressz az mTORC1-től független útvonalon képes fokozni az autofágiát. Ezért kíváncsian vártuk, hogyan befolyásolja a palmitát a BMDM-ekben az autofágiás útvonalakat. Az mTORC1 utat gátló rapamycin, AICAR és Y-27632 kezelések önmagukban fokozták az LC3-II/LC3-I arányt, amely az autofágia fokozódását jelzi a BMDM-ekben. A p62 fehérje mennyisége ezzel szinkronban csökkent ezen kezelések hatására.

A palmitát adását követően azonban jelentősen megnövekedett p62 szintet detektáltunk, amely az autofagoszóma-lizoszóma késleltetett fúziójára vagy a fúzió gátlására utalt, következményes LC3 felhalmozódást eredményezve a lizoszómákkal egyesülni nem tudó autofagoszómákban. A rapamycin, AICAR, Y-27632 kezelések palmitát jelenlétében szignifikánsan csökkentették a p62 szinteket. Ebből arra következtethetünk, hogy az mTORC1 útvonal gátlói képesek feloldani a palmitát által okozott autofagoszóma-lizoszóma fúzió blokkot, így engedik, hogy a palmitát általi ER stressz indukálta autofágiás folyamat akadály nélkül működhessen.

### 5.1.6. A palmitát gátolja a felvett apoptotikus timociták lizoszómába jutását is

Ha a palmitát kezelés hatására aktivált mTORC1 útvonal gátolja az autofágiás vakuólumok és a lizoszómák fúzióját, gátolhatja a fagoszómák és a lizoszómák fúzióját is, mert lényegében ugyanazon fehérjék vesznek részt ezen organellumok fúziójában. Hogy a feltételezéseinket mikroszkópos vizsgálattal is alátámasszuk, a BMDM-ek lizoszómáját LysoTracker, míg az apoptotikus sejteket DeepRed fluoreszcens festékkel jelöltük meg, majd követtük az apoptotikus sejtek megjelenését a lizoszómákban. Palmitát kezelés esetében nagyon alacsony számú apoptotikus sejtet tudtunk detektálni a lizoszómákban a többi kezeléshez képest. E megfigyeléseink arra utalnak, hogy az mTORC1-RhoA-ROCK jelátviteli útvonal aktivációja interferál a fagoszóma-lizoszóma fúziós

útvonallal. Fontos megjegyezni azonban, hogy nem zárhatjuk ki annak lehetőségét sem, hogy csupán az apoptotikus sejtek késleltetett felvétele magyarázza a késői megjelenésüket a lizoszómákban.

## 5.2. A Mer hiányának hatása magas zsírtartalmú diétával kiváltott patológiás elváltozásokra egerekben

### 5.2.1. Mer-null egerek esetében kisebb súlygyarapodás figyelhető meg magas zsírtartalmú diéta hatására

Normál diétán (ND) tartottegerekhez képest a vad típusú egerekben magas zsírtartalmú diéta (HFD) hatására markáns elhízás alakult ki. A HFD vagy ND étrenden tartott egerek testtömege 38,6±2 vs. 29,6±1,5g volt. A Mer hiánya nem befolyásolta a testtömeget szignifikánsan az etetési szakasz kezdetén. A Mer+/+ és Mer-/- egerek esetében a testtömeg 19,0±0,6 vs. 18,1±2,4g volt. Hosszabb távon a normál diétán tartott vad típusú egerekhez képest a Mer-null egerek lassabb súlygyarapodást mutattak: 29,6±1,5 vs. 27.0±0,9. A Mer-/- egerek csökkent testtömeg-gyarapodási képessége a vad típusú alomtársaikhoz képest sokkal kifejezetteb volt, ha HFD-n voltak tartva. Ez a különbség a BMI esetében is megmutatkozott. A gonadális zsírszövet (gWAT) tömege a Mer-/- egerek esetében szignifikánsabban alacsonyabb volt a Mer+/+ egerekhez képest HFD étrenden tartva. A gWAT-ban bekövetkezett tömegnövekedés az adipociták átlagos méretének megnövekedésében is megmutatkozott, amit hisztológiai metszetek segítségével detektáltunk. Korábbi vizsgálatok alapján bizonyított, hogy az adipociták hipertrófiája fokozott gyulladási citokin és megváltozott adipokin termeléssel jár, ezért meghatároztuk néhány proinflammatorikus citokin mRNS expressziós szintjét a gWAT adipocitáiban. Az irodalmi adatoknak megfelelően a monocita kemoattraktáns fehérje 1 (MCP-1), a tumor nekrózis faktor α (TNF), az interleukin 6 (IL6), a rezisztin és a leptin fokozott expressziót mutattak a vad típusú HFD-n tartott egerek esetében, míg az adiponektin szintje csökkent. A HFD-n tartott Mer-null egereknél azonban nem mutattunk ki megváltozott expressziót ezen molekulák esetében. Összegezve az eredményeket elmondhatjuk, hogy a Mer hiánya HFD étrenden tartott egerekbe véd a súlygyarapodástól, illetve a gyulladás kialakulásától.

### 5.2.2. A Mer hiánya védi az egereket a HFD étrend által kiváltott gyulladás, zsírmáj és inzulinrezisztencia kialakulásától

HFD étrend hatására számos proinflammatorikus citokin és a rezisztin esetében is magas mRNS expressziót detektáltunk a vad típusú egerek zsírszöveti makrofágjaiban szemben a Mer-null egerek

makrofágjaival. Az ND étrenden tartott vad típusú egerek makrofágjaiban magas, míg a HFD étrenden tartott egerek proinflammatorikus makrofágjaiban alacsony Mer expressziót figyeltünk meg, Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a HFD étrenden tartott Mer-/- egerekben a Mer-null adipociták nem lesznek hipertrófiások, illetve gyulladás sem alakul ki a Mer-null zsírszövetekben.

Ismert, hogy a HFD étrend hatására kialakult gyulladás és megváltozott adipokin termelés összefüggésbe hozható az inzulin rezisztencia és a zsírmáj kialakulásával, ezért megvizsgáltuk ezen folyamatokat is. Az ND és HFD étrenden tartott egerek májtömege között nem volt különbség. A HFD étrenden tartott vad típusú egerek májában azonban szignifikánsan magasabb triacilglicerol koncentrációt detektáltunk az ND étrenden tartott egerekhez képest. Ezen eredményekkel ellentétben a Mer-/- egerek májában mért triacilglicerol koncentráció az ND étrenden tartott egerekhez hasonlítva nem növekedett a HFD étrend hatására sem. Az eredményeink a hematoxilin-eozinnal megfestett májmetszetek képeivel összhangban állnak. Ezt követően meghatároztuk az inzulinrezisztenciát. A HFD étrenden tartott vad típusú egerek fokozott mértékű inzulinrezisztenciát mutattak a Mer-/- egerekkel szemben. Ezeket az eredményeket alátámasztották a HFD étrenden tartott Mer+/+ egerekben mért fokozott kompenzatórikus szérum inzulin szintek is. A Mer-null egerek szérum inzulin szintjeiben ugyanakkor nem következett be szignifikáns változás. Eredményeink alapján a Mer hiánya az egerekben véd a gyulladás, a zsírmáj és az inzulinrezisztencia kialakulása ellen.

### 5.2.3. A Mer hiánya a nem hematopoietikus sejteken véd a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás ellen

A Mer-/- egerekkel kapott eredmények alátámasztották, hogy Mer hiánya véd a HFD által kiváltott elhízás, metabolikus szindróma és zsírmáj kialakulása ellen, így kíváncsiak voltunk, hogy magas zsírdiétával szemben kialakuló védettség a csontvelő-eredetű sejtek, vagy egyéb sejtek Mer hiányának a következménye-e. A kérdés megválaszolásához vad típusú és Mer-null egereket kobaltágyúval sugároztunk be, hogy elpusztítsuk a csontvelőt, majd csontvelő transzplantációt hajtottunk végre. Kontrollként vad típusú egérbe vad típusú csontvelőt ültettünk, illetve a kérdés megválaszolásához Mer-/- csontvelőt vad egerekbe, illetve vad egerekből származó csontvelőt Mer-/- egerekbe transzplantáltunk. A korábbiakban elvégzett kísérletsorozatot a transzplantált egerek esetében is elvégeztük. Az irodalmi adatoknak megfelelően a besugárzott egerek esetében lényegesen kisebb súlygyarapodást figyeltünk meg az etetési időszak végén a korábban bemutatott nem besugárzott társaikhoz képest. Ennek ellenére a kialakult testtömeg változások egyértelműen demonstrálták, hogy míg a Mer hiánya a hematopoietikus sejtekben nem volt kedvező hatással a HFD étrend által kiváltott súlygyarapodásra, a Mer hiánya a nem hematopoietikus sejteken védő hatásúnak

bizonyult a zsírdiéta elhízást kiváltó hatásával szemben, legalábbis az etetési időszak korai szakaszában.

Ahogy eredetileg vártuk, a HFD étrenden tartott egerek esetében a Mer hiánya a hematopoietikus sejtekben nagyobb gWAT tömeget eredményezett a vad típusú egerekhez hasonlítva. Ez a különbség még kifejezettebb volt, ha azokhoz az egerekhez hasonlítottuk, melyekben a Mer a nem hematopoietikus sejtekből hiányzott. A hematoxilin-eozinnal megfestett szöveti metszetek arra is rámutattak, hogy azokban az egerekben, amelyekben a Mer a hematopoietikus sejtekből hiányzott már ND étrend esetében is nagyobb adipocita méret volt megfigyelhető a többi csoporthoz képest.

A testtömeg adatoknak megfelelően valamennyi triacilglicerol tartalom növekedés mindhárom fajta egér májában kimutatható volt zsírdiétán, és ez is azokban az egerekben volt a legkifejezetteb, amelyekben a Mer a hematopoetikus sejtekből hiányzott. Az inzulinérzékenységet tekintve a mérés időpontjáig még nem alakult ki szignifikáns különbség a csoportok között ilyen alacsony súlygyarapodás mellett. Az eredményeket összefoglalva azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Mer hiánya a nem hematopoietikus sejtekben játszik szerepet a HFD étrend hatására kialakuló elhízás elleni védelemben az egerekben, és ez eltakarja a mieloid Mer-/- fenotípust.

# 6. MEGBESZÉLÉS

Az elhízás a napjainkban több, mint 650 millió felnőttet és 340 millió gyermeket érintő probléma. Az elhízás jellemzője a zsírszövet kóros felhalmozódása a testben, amely komoly egészségügyi kockázatot jelent, és gyakran társul krónikus alacsony szintű gyulladással.

A krónikus alacsony szintű gyulladás kialakulása, illetve a makrofágok efferocitózisa szoros kapcsolatot mutatnak. Az apoptotikus sejtek eltávolítása a makrofágok által része a normál szöveti homeosztázisnak, hiszen egyrészt elősegíti a szöveti integritás megtartását, illetve fontos szerepe van a szövetkárosító gyulladás megelőzésében. A nagymennyiségű lipiddel teli apoptotikus adipociták makrofágok általi bekebelezése önmagában is egy gyulladást kialakulását elősegítő folyamat lehet. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a makrofágok az apoptotikus adipociták lipidtartalmát képesek lipid tartalmú exztacelluláris vezikulák formájában felvenni és eloxidálni, ezáltal csökkentve a perifériás szövetek ektopikus zsírterhelését. TG2 hiányában, ez a folyamat sokkal hatékonyabb, valószínűleg az adipociták kompenzatórikusan magasabb integrin β3 kifejeződése miatt, amelyről ismert, hogy részt vehet a PS-t kifejező extracelluláris vezikulák felvételében. Feltételezzük, hogy a Mer tirozin-kináz is hasonló szereppel bírhat, mivel a Mer szerepét is bizonyították már PS-pozitív extracelluláris vezikulák felvételében. Ha az apoptotikus sejtek eltávolítása zavart szenved, akkor az el nem takarított sejtek másodlagos nekrózison mennek keresztül. A nekrózis során olyan intracelluláris molekulák szabadulnak fel a sejtekből, amelyek gyulladás kialakulásához vezetnek. Folyamatos képződésük, és az eltakarítás zavara miatt kialakuló makrofág polarizáció zavar együttesen krónikus gyulladás kialakulásához vezethet. Ez elhízásban kialakul a zsírszövetben, de a telített zsírsavak keringésben történő felszaporodása miatt a más szövetekben működő makrofágok efferocitózis képessége is csökkent lehet. A krónikus gyulladás kialakulása képezi az alapot számos az elhízáshoz társult betegség kialakulásához, mint például az ateroszklerózis, krónikus obstruktív tüdőbetegség, reumás megbetegedések, vagy a szájüreget érintő gyulladások.

A krónikus alacsony szintű gyulladás fokozza a makrofágok akkumulációját a zsírszövetben, amely a zsírszövet diszfunkcióját okozza. Fokozódik a lipogenezis, de idővel csökken a zsírszövet további lipidtároló kapacitása, megváltozik az adipokin termelődés, illetve fokozódik a zsírsejtek nekrózisa okoz a zsírszövetben. Mindez részben a makrofágok és az adipociták között létrejövő patológiás interakció eredménye. A zsírszöveti makrofágok a kutatások alapján jó célpontnak bizonyulnak az elhízás kezelésében. Ilyen célpont lehet például a makrofág polarizáció, a makrofág gyulladásos útvonalak, a makrofág metabolikus útvonalak, inzulin jelátviteli útvonal, az energia érzékelő útvonalak. Ezen jelátviteli útvonalak befolyásolásával hatással lehetünk az adipociták

működésére, oly módon, hogy akár megakadályozhatjuk az elhízást és a hozzá kapcsolódó metabolikus megbetegedések kialakulását is.

Disszertációm első részében azt vizsgáltam, hogy a palmitát hogyan befolyásolja az apoptotikus sejtek BMDM-ek általi felvételét annak érdekében, hogy új gyógyszercélpontot azonosítsunk. A disszertációm második felében a szöveti makrofágok által magasan expresszált és az apoptotikus sejtek eltakarításában résztvevő Mer tirozin-kináz szerepét teszteltem a zsírszövet homeosztázisának fenntartásában.

A palmitát efferocitózisra gyakorolt hatásának vizsgálata során arra kerestük a választ, hogy a palmitát valóban csökkenti-e a BMDM-ek apoptotikus sejtfelvételét, és ha igen, akkor ez milyen mechanizmuson keresztül valósulhat meg. Az első vizsgálataink megerősítették, hogy a palmitát dózis függő módon csökkenti a BMDM-ek apoptotikus sejtfelvételét. Ezt követően azt szerettük volna megtudni, hogy a palmitát milyen mechanizmuson keresztül fejti ki az efferocitózist csökkentő hatását. A palmitátról korábban kimutatták, hogy képes ER stresszt indukálni és ezáltal apoptózist elindítani a makrofágokban. Úgy gondoltuk, hogy a csökkent fagocitózis hátterében a BMDM-ek fokozott sejthalála is állhat, ezért megvizsgáltuk, hogy a palmitát kezelés hogyan befolyásolja a BMDM-ek életképességét. Eredményeink azt mutatták, hogy az általunk használt palmitát koncentrációk nem csökkentették szignifikánsan a BMD-ek életképességét.

Mivel az efferocitózis első lépése in vitro körülmények között és az „egyél meg” szignálok általi felismerés, úgy gondoltuk, hogy a palmitát befolyásolhatja az apoptotikus sejtek felismerésében résztvevő receptorok kifejeződését BMDM-ekben. Ennek bizonyítására a BMDM-eket palmitáttal kezeltük, és megvizsgáltuk néhány fagocitózisban résztvevő gén expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy a palmitát nem befolyásolta ezen gének kifejeződését. Egy gén, a zsírsavak felvételében is résztvevő CD36 esetében találtunk szignifikáns növekedést.

A nagy mennyiségű zsírsav felvétele által a BMDM-ek energiaterhelése is fokozódik, ezért megvizsgáltuk, hogy a palmitát hogyan hat az energiaérzékelő útvonalakra, illetve, hogy az energiaérzékelő útvonalak befolyásolhatják-e az elhalt sejtek fagocitózisának kapacitását. A palmitát kezelés csökkentette az AMPK aktivitását a BMDM-ekben, amely a sejtek fő energiaérzékelő fehérjéje, és energiatöbblet esetén csökkent aktivitást mutat. Az AICAR az AMPK ismert aktivátora, ezért megvizsgáltuk, hogy az AMPK aktiválásával alacsony energiaszintet indikálva lehetséges-e fokozni a fagocitózist. Az AMPK aktiválásával valóban képesek voltunk a palmitát efferocitózisra gyakorolt negatív hatását ellensúlyozni, és fokozni a BMDM-ek apoptotikus sejtfelvételét.

Az AMPK-ról ismert, hogy hatásainak egy részét az mTOR aktivitásának szabályozásán keresztül fejti ki, ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a palmitát az mTOR aktivitását a BMDM-ekben. A palmitát kezelés szignifikánsan fokozta az mTORC1 aktivitást, azonban az mTORC2 aktvitást nem befolyásolta. Az AMPK-hoz hasonlóan szerettük volna megtudni, hogy az

mTORC1 gátlása rapamycinnel, az mTORC1 szelektív inhibitorával, fokozza-e az efferocitózist. Az mTORC1 gátlásával a palmitát-kezelt makrofágokban valóban képesek voltunk szignifikánsan fokozni az efferocitózist.

Mivel a palmitát nem a fagocitózisban résztvevő gének expressziós szintjeinek befolyásolásán keresztül fejtette ki hatását, megvizsgáltuk az efferocitózis jelátviteli útvonalakra gyakorolt hatását. A palmitát szignifikánsan fokozta a makrofágokban a RhoA aktivitást, amely az efferocitózis negatív szabályozója. Egyúttal az mTORC1 inhibitor rapamycin viszont gátolta a RhoA aktivitást. A palmitát által kiváltott efferocitózis gátlásban a RhoA útvonal szerepét bizonyítja, hogy palmitát kezelés hatására fokozott ROCK1 aktivitást detektáltunk, amely rapamycin kezelés hatására csökkent. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy lehetséges-e az efferocitózis fokozása a RhoA gátlásán keresztül. A makrofágok Y27632, egy specifikus RhoA inhibitor, kezelésével sikeresen visszafordítottuk a palmitát efferocitózisra gyakorolt gátló hatását. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az mTORC1 részt vesz a RhoA/ROCK1 jelátviteli útvonal szabályozásában.

Az AMPK és az mTOR jelátviteli útfonal fontos szabályozója az autofágiának és számos ponton átfednek az efferocitózis jelátviteli útvonalával, azonban az mTORC1 útvonal nem mutat átfedést az LC3 mediált fagocitózissal, ezért megvizsgáltuk a palmitát autofágiára gyakorolt hatását. A palmitát az AMPK/mTORC1 útvonal aktiválásával képes gátolni az autofágiát több ponton is, egyik ilyen az autofagoszóma lizoszóma fúzió gátlása, amely az AMPK-n és az mTOR-on keresztül is megvalósulhat. A palmitát azonban ER stresszt, és az ER stresszen keresztül egy az mTORC1 által nem szabályozott autofágiás folyamat aktiválódását is eredményezi. Az ER által aktivált autofágia, és az mTORC1 útvonal által gátolt autofagoszóma/lizoszóma fúzió az autofagoszómák felhalmozódásához vezet palmitátnak kitett makrofágokban, amelyet az LC3-II és a p62 mennyiségének felhalmozódásán keresztül érzékeltünk. Az mTORC1 útvonal gátlása AICAR, rapamycin, Y-27632 segítségével a BMDM-ekben képes volt feloldani a palmitát hatására bekövetkező autofagoszóma/lizoszóma fúzió gátlást, elindult a lizoszomális lebontás, amit a p62 szintek csökkenésén keresztül detektáltunk.

Mivel a fagocitózis folyamata során a bekebelezett sejtet körülvevő membránt pótolni kell, azok az endoszómákból és a lizoszómákból kerülnek újrahasznosításra. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a palmitát efferocitózis gátló hatása annak köszönhető, hogy a palmitát kezelés hatására bekövetkező defektív autofágia miatt nem áll rendelkezésre elegendő membrán a fagocitózis zavartalan folyamatához. De elképzelhető az is, hogy az aktivált mTORC1 útvonal a fagoszómák és a lizoszómák fúzióját is gátolja, mert a két folyamatban sok azonos fehérje vesz részt.

Az AMPK aktivátorokat jelenleg is alkalmazzák az elhízás kezelésében. Eredményeink azt mutatják, hogy az AMPK aktiválása elhízott emberekben képes lehet a csökkent efferocitózist kompenzálni, ezáltal hozzájárulni az AMPK aktiválásával kiváltott jól ismert kedvező metabolikus

hatásokhoz. Eredményeink továbbá azt is mutatják, hogy a ROCK inhibitorok alkalmazása is elősegítheti az elhízáshoz kapcsolt csökkent efferocitózis javítását. A vizsgálatokat makrofágokon végeztük, azonban más sejttípusokra is érvényes lehet. Hepatocitákban például a palmitát szintén mTORC1 és ROCK1 aktiválásához vezet. Disszertációm első részének eredményeit összefoglalva elmondható, hogy AMPK aktivátorok vagy a ROCK inhibitorok kedvező hatással bírhatnak a lipotoxicitás kezelésében a defektív autofága javításán keresztül, amelynek oka a szabad telített zsírsavak felhalmozódása a sejtekben.

Disszertációm második részében a Mer tirozin-kináz zsírszöveti homeosztázisban betöltött szerepét vizsgáltam. A Mer a szöveti, valamint az M2 fenotípusú makrofágokban fejeződik ki nagy mértékben. E sejtekben mind az efferocitózis, mind a gyulladásgátlás indításának meghatározó molekulája. Zsírszöveti makrofágokban az adipocitákból felszabaduló PS-pozitív, lipid tartalmú extracelluláris vezikulák átvételében is szerepet játszhat. Munkánk kezdetén azt feltételeztük, hogy a Mer részt vesz a magas zsírtartalmú étrend által kiváltott elhízás és gyulladás elleni védelemben, így a hiánya következtében fokozott elhízás, gyulladás, illetve inzulinrezisztencia alakulhat ki. Már az első kísérletünkben, amelyben ND-n és HFD-n tartott vad típusú és Mer-/- egereket hasonlítottunk össze meglepő módon, a hipotézisünkkel ellentétesen, azt találtuk, hogy a Mer-/- egerek HFD étrend esetében kisebb mértékű elhízást mutatnak a vad típusú társaikhoz képest. Ez megmutatkozott a gWAT tömegében, illetve a fehér zsírsejtek méretében, valamint a BMI-ben is. Mer-/- egereknél sem a gWAT tömege, sem a zsírsejtek mérete nem növekedett szignifikánsan HFD étrend hatására. Ezen eredményekkel összhangban a HFD étrenden tartott Mer-/- egerek gonadális zsírszövetében nem figyeltünk meg sem fokozott proinflammatorikus citokin expressziót, sem pedig megváltozott adipokin termelést. Ezzel ellentétben, a vad típusú egereknél az irodalmi adatoknak megfelelően, szignifikánsan nőtt az MCP-1, TNF-α, IL-6 expresszió, amely az elhízás következményeként kialakult fokozott gyulladásra utal, továbbá a rezisztin és leptin mRNS mennyisége is növekedett, míg az adiponektin szintek szignifikánsan csökkentek. Mindezek a változások az adipokin termelés egyensúly felborulásának következményei. Ezen eredmények azt mutatják, hogy Mer hiányában sem fehér zsírszöveti hipertrófia, sem az ezzel összefüggésbe hozható gyulladás és adipokin termelődési zavar nem alakul ki a zsírszövetben.

Az elhízás gyakran társul nem alkoholos zsírmájjal, metabolikus szindrómával és inzulinrezisztenciával, ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan hat a Mer hiánya ezen szövődmények kialakulására. HFD étrend hatására a vad típusú egerekben megfigyelhető volt a máj elzsírosodása, melyet a májtömeg növekedése, a máj fokozott trigliceridtartalma mutatott, illetve ezt a szövettani vizsgálat is megerősített. Az inzulinrezisztencia vizsgálatok azt mutatták, hogy a HFD étrenden tartott vad típusú egerekben inzulin rezisztencia alakult ki, amelyhez kompenzatorikus szérum inzulin szint emelkedés társult. Ezzel ellentétben, a Mer-/- egerekben sem zsírmáj, sem inzulinrezisztencia nem

alakult ki, amely azt bizonyítja, hogy a Mer hiánya véd az elhízás következményeként megjelenő zsírmáj és inzulinrezisztencia kialakulásával szemben is.

Mivel a kapott eredmények a várt eredményekkel ellentétesek voltak, megvizsgáltuk, hogy az általunk tapasztalt Mer hiányában kialakuló elhízással szembeni védőhatást vajon a csontvelő-eredetű sejtek, vagy más sejtek Mer hiánya okozza-e. Ennek vizsgálatához vad típusú és Mer-/- egerekben sugárzással elpusztítottuk a csontvelőt és csontvelő átültetést végeztünk vad típusú vagy Mer-/- egerekből. Habár a besugárzott egerek a nem besugárzott egerekhez képest kisebb súlygyarapodást mutattak a besugárzás következményeként, így is látható volt, hogy a Mer hiánya a hematopoietikus sejtekben nem védett a HFD étrend által kiváltott súlygyarapodással szemben. Sőt, ha a Mer a hematopoietikus sejtekből hiányzott, mind ND-n, mind HFD-n a vad típusú egereknél nagyobb gWAT-ot és zsírsejteket detektáltunk. Ezek az eredmények eredeti hipotézisünket támasztották alá, hogy a Mer a makrofágokban kifejeződve pozitívan hat a zsírszöveti homeosztázis fenntartására.

Abban az esetben azonban, ha a Mer a nem hematopoietikus sejtekből hiányzott, az egerek védettek voltak a HFD étrend által kiváltott súlygyarapodástól, legalábbis az etetési időszak elején. Ezt megerősítette a gWAT tömege, a zsírsejtek mérete és a máj triacilglicerol tartalma is. Azok az egerek, amelyekben a Mer a nem hematopoietikus sejtekből hiányzott, szignifikánsabban kisebb gWAT tömeget mutattak a zsírsejtek nagysága is kisebb volt, valamint a máj triacilgricerol tartalma is alacsonyabb volt, mint azoknál az egereknél, ahol a Mer a hematopoietikus sejtekből hiányzott. Az inzulinrezisztencia azonban ilyen mértékű súlygyarapodásnál még nem alakult ki egyik egércsoportban sem. Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a Mer hiánya a nem hematopoietikus sejtekben ND és HFD étrenden is megváltozott zsírszöveti hipertrófiához vezet.

Az már nem általam végzett további kísérletekben munkatársaim kimutatták, hogy a Mer az adipocitákon is kifejeződik, hogy a fehér zsírsejtekben fokozza a hipertrófiát, míg a barna zsírsejtekben hőtermelést gátló hatása van. Ezen hatások elmaradása Mer-/- egerekben olyannyira meghatározza a felvett energia sorsát az elégetés irányába tolva azt, hogy még HFD-n sem alakul ki a fehér zsírsejtekben hipertrófia. Ezért az adipocita Mer-/- fenotípus eltakarja a makrofág Mer-/- fenotípus jellemzőit olyan egerekben, ahol a Mer a teljes szervezetben hiányzik.

A Mer tirozin kináz mellett csoportunk detektálta a másik két TAM kináz kifejeződését is adipocitákban. A Tyro3 szerepét még nem vizsgálták adipocitákon, de az Axl szerepét igen. Érdekes módon ezek a vizsgálatok a barna zsírsejtek differenciációját szabályozó kinázok kereséséből indultak el, és azt találták, hogy az Axl a Mer tirozin kinázhoz hasonlóan gátolja a barna zsírszövet hőtermelését, és eredményeinkhez hasonlóan az Axl hiánya is védett a HFD indukálta elhízással szemben. Ezek a vizsgálatok nem tesztelték az Axl lehetséges szerepét egér gonadális zsírsejteken. Az Axl esetében azonban kimutatták az Axl kifejeződését humán fehér zsírsejteken, sőt a szubkután zsírsejtek fokozott Axl kifejeződését találták elhízott egyénekben.

Ezek a vizsgálatok nem tesztelték a Mer zsírszövetbeli kifejeződését, de genetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy a Mer tirozin kináz loss-of-function rs4374383 G > A variánsa esetén kifejezettebb zsír oxidáció és fokozott inzulin érzékenység mutatható ki. Emellett az eredetileg egészséges, nem túlsúlyos, nem diabeteses, inzulin érzékeny egyénekben a MERTK G > A variáns védelmet biztosított a nem alkoholos zsírmáj kialakulásával és súlyosságával, és a 2-es típusú diabetes kialakulásával szemben 9 éven keresztül követve. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az egérben találtakhoz hasonlóan a Mer funkció csökkenése az emberi szervezetben is véd az elhízással, illetve az elhízáshoz kapcsolódó patológiás történések kialakulásával szemben.

Eredményeim azt mutatják, hogy ugyanazon receptor két sejttípusban kifejeződve is szabályozza a zsírhomeosztázist. A zsírszöveti makrofágokban hatva hozzájárul a zsírhomeosztázis fenntartásához, és védelmet nyújt az elhízással szemben. Ebben mindegyik makrofágokon már ismert hatása részt vehet. Azaz segíti a normális szöveti turnover kapcsán elhaló adipociták eltakarítását, aktivációja gyulladásgátlást eredményez, és átveheti a felesleges zsírt az adipocitáktól, csökkentve azok felhalmozódó zsírtartalmát. A Mer aktivációját nemcsak az apoptotikus sejtekkel történő interakció, hanem ligandjainak - Protein S és Gas6 - kötődése is elősegítheti. Érdekes módon, mind a makrofágok, mind a zsírsejtek képesek ezen ligandok termelésére. Így izgalmas lehet, hogy nyugalmi körülmények között mely sejt által termelt ligand az, amely a Mer aktivitását szabályozza. Jelen vannak-e ezek a ligandok már a zsírsejtek által kibocsájtott vezikulákon is előkészítve azokat a Mer általi felvételre? Vagy a makrofág Mer-en helyezkednek el? HFD esetén azonban a szöveti makrofágok helyét a beáramló gyulladásos csontvelő-eredetű makrofágok foglalják el. Ezek nem a Mer, hanem az ugyancsak a TAM kináz családba tartozó Axl tirozin-kinázt fejezik ki. Így a zsírdiéta által kiváltott zsírszöveti gyulladás regulációjában a makrofág Mer valószínűleg nem vesz részt. Az a tény azonban, hogy teljes hiánya véd az elhízás kialakulásával szemben, a Mer tirozin-kinázt egy lehetséges elhízást befolyásolható támadáspontként jelöli ki.

Összefoglalóan disszertációmban két az elhízáshoz kapcsolódó makrofág efferocitózis viselkedést vizsgáltam, és mindkét vizsgálat jelölt ki olyan potenciális molekulákat, melyek működésének szabályozásával az elhízás, illetve az elhízáshoz kapcsolódó szövődmények befolyásolhatóak lehetnek.

# 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elhízás gyakran társul krónikus alacsony szintű gyulladással. Ennek oka a zsírsejtek folyamatos növekedése (hipertrófiája) és következményes fokozott sejthalála, amely csontvelői eredetű makrofágokat vonz be. A kilépő makrofágok e lipid gazdag sejteket felvéve gyulladásos irányba alakulnak. Kutatások azt mutatják, hogy elhízásban csökkent a makrofágok apoptotikus sejt eltakarítási képessége, amelynek oka a vérben keringő szabad zsírsavak megnövekedett szintje. A szabad zsírsavak, mint például a palmitát képes befolyásolni a makrofágok efferocitózisát. Disszertációmban azt vizsgáltam, hogy a palmitát milyen mechanizmusokon keresztül fejti ki gátló hatását a makrofágok efferocitózisára, továbbá vizsgáltam azt is, hogy egy a makrofágok által kifejezett, fagocitózisban résztvevő receptor a Mer tirozin kináz hiánya milyen metabolikus következményekkel jár az elhízásban.

Eredményeim azt mutatják, hogy a palmitát dózisfüggő módon gátolja a csontvelő-eredetű makrofágok (BMDM-ek) efferocitózisát. A palmitát egyrészt fokozza az autofágiát, másrészt aktiválja az AMPK/mTORC1/ROCK1 energiaérzékelő jelátviteli útvonalat, amely gátolja az autofagoszóma-lizoszóma fúziót. Az autofagoszóma-lizoszóma fúzió gátlásának következtében a sejtmembránok felhalmozódnak az autofagoszómómákban. Feltételezésünk szerint a palmitátnak kitett BMDM-ekben az efferocitózis gátlását az okozza, hogy nem áll rendelkezésre elegendő plazmamembrán az efferocitózis folyamatának zavartalan működéséhez. Vizsgálataink alapján az AMPK aktivátorok mTORC1 gátláshoz vezettek és ezáltal a pamitát által kiváltott efferocitózis gátlás feloldásra került. Eredményeim arra utalnak, hogy az AMPK aktivátorok hasznosnak bizonyulhatnak az elhízás kezelésében nem csak a metabolizmusra gyakorolt kedvező hatásuk miatt.

A Mer tirozin kináz esetében feltételeztük, hogy makrofágokon efferocitózis receptorként működve részt vesz az elhízás elleni védelemben. Meglepetésünkre a Mer-/- egerek védettek voltak a magas zsírtartalmú diéta (HFD) által kiváltott elhízás, és az ehhez kapcsolódó gyulladás kialakulásával szemben. Mer hiányában HFD étrend hatására nem alakult ki sem zsírmáj, sem inzulinrezisztencia. A csontvelőtranszplantációs kísérletek viszont azt mutatták, hogy ezért a fenotípusért a nem hematopoietikus sejtek (zsírsejtek) által expresszált Mer felelős. A hematopoetikus sejtekben hiányzó Mer azonban valóban fokozott zsírraktározást eredményezett mind normál diéta (ND), mind HFD étrenden tartott egerekben. Ezt azonban az adipocita Mer hiány elfedte. Az eredmények összessége arra utal, hogy a Mer aktivitásának szabályozása is gyógyszercélpont lehet a testsúly szabályozásában.

# 8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/371/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sós László
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076380

**A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények**

1. Köröskényi, K., **Sós, L.**, Rostás, M., Papp, A. B., Kókai, E., Garabuczi, É., Deák, D., Beke, L., Méhes, G., Szondy, Z.: Loss of MER Tyrosine Kinase Attenuates Adipocyte Hypertrophy and Leads to Enhanced Thermogenesis in Mice Exposed to High-Fat Diet.
*Cells. 13* (22), 1-20, 2024.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cells13221902
IF: 5.1 (2023)

2. **Sós, L.**, Garabuczi, É., Sághy, T., Mocsár, G., Szondy, Z.: Palmitate Inhibits Mouse Macrophage Efferocytosis by Activating an mTORC1-Regulated Rho Kinase 1 Pathway: Therapeutic Implications for the Treatment of Obesity.
*Cells. 11* (21), 1-18, 2022.
DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cells11213502
IF: 6

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

## További közlemények

3. Vincze-Fige, É., Sarang, Z., **Sós, L.**, Szondy, Z.: Retinoids Promote Mouse Bone Marrow-Derived Macrophage Differentiation and Efferocytosis via Upregulating Bone Morphogenetic Protein-2 and Smad3.
   *Cells. 11* (18), 1-22, 2022.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cells11182928
   IF: 6

4. Vincze-Fige, É., Szendrei, J., **Sós, L.**, Kraszewska, I., Potor, L., Balla, J., Szondy, Z.: Heme Oxygenase-1 Contributes to Both the Engulfment and the Anti-Inflammatory Program of Macrophages during Efferocytosis.
   *Cells. 10* (3), 652-669, 2021.
   DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cells10030652
   IF: 7.666

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,766**
**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,1**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.06.05.