

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A tiamin transzporterek szerepének feltárása a
humán adipociták hőtermelő aktivitásában**

Vinnai Boglárka Ágnes

Témavezető: Dr. Kristóf Endre Károly



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

A TIAMIN TRANSZPORTEREK SZEREPÉNEK FELTÁRÁSA A HUMÁN ADIPOCITÁK HŐTERMELŐ AKTIVITÁSÁBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Vinnai Boglárka Ágnes okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Kristóf Endre Károly

Az értekezés bírálói:

Dr. Lontay Beáta, az MTA doktora
Dr. Kovács Dávid, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Lontay Beáta, az MTA doktora
Dr. Kovács Dávid, PhD
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Vas Virág, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme
2026. szeptember 1-jén, 13 órakor

1. BEVEZETÉS

1.1. Az adipociták típusai és funkcionális jellemzőik

Az emberi zsírszövet összetett és funkcionálisan diverz rendszert alkot, amely különféle típusú adipocitákat tartalmaz, eltérő morfológiai és metabolikus sajátosságokkal. A szervezetben legnagyobb mennyiségben előforduló zsírszövet a fehér, amely kulcsszerepet tölt be az energiahomeosztázis szabályozásában, elsősorban azáltal, hogy a felesleges energiát triacilglicerolok (TAG-ok) formájában tárolja. Anatómiai elhelyezkedés alapján a fehér zsírszövet két főbb csoportra osztható: szubkután és vizcerális depókra. A szubkután zsírszövet a bőr alatti rétegekben, elsősorban a hasi és gluteofemorális régiókban található, és a teljes testzsír több mint 80%-át alkothatja. Ezzel szemben a vizcerális zsírszövet a hasüregben, például az omentális és mezenterialis területeken helyezkedik el. Míg egerek esetében a gonadális zsírszövet szekréta a szisztémás keringésbe kerül, addig emberben a vizcerális zsírszövet által szekretált molekulák a portális keringésbe irányulnak, amely metabolikus szempontból lényeges különbséget jelent.

A fehér zsírszövetben található adipociták morfológiailag nagy, gömb alakú sejtek, amelyeket egyetlen, nagy lipidcsepp tesz ki. Ezek a sejtek alacsony mitokondrium számmal rendelkeznek, és fő feladatuk az energiatárolás, illetve annak felszabadítása a szervezet aktuális igényei szerint. A fehér zsírszövet ugyanakkor endokrin szerveként is ismert, hiszen számos adipokint szekretál, amelyek az inzulinérzékenység (pl. leptin, adiponektin), inzulinrezisztencia (pl. rezisztin, RBP4) és gyulladásos folyamatok (pl. TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8) szabályozásában vesznek részt.

A fehér zsírszövettel ellentétben a barna zsírszövet, valamint a bézs adipociták elsősorban hőtermelő, azaz termogenikus funkciójukról ismertek. Bár ezek a sejtek kisebb arányban vannak jelen a test összes zsírtömegéhez képest, metabolikus hatásuk jelentős. Aktivált állapotban akár 40–80%-kal is növelhetik a szervezet energiafelhasználását. A barna és bézs adipociták több apró lipidcseppet tartalmaznak, magas mitokondrium sűrűséggel rendelkeznek, és intenzíven expresszálják az UCP1 (szétkapcsoló fehérje 1) nevű fehérjét, amely kulcsszerepet játszik a hőtermelés folyamatában. A barna zsírszövet fejlődése már embrionális korban megkezdődik, és újszülöttekben olyan régiókban található meg, mint a nyaki, hónalji, vese és mellékvese körüli területek. Ezek a depók a későbbi életkorban visszafejlődnek, viszont PET/CT vizsgálatok kimutatták, hogy felnőttekben is előfordulhat aktív barna zsírszövet, elsősorban a kulcscsont feletti és a nyaki régiókban. E területek sejtjei morfológiailag hasonlítanak a klasszikus barna adipocitákra, illetve képesek fokozott glükózfelvételre is.

A bézs adipociták a fehér zsírszöveten belül, elszórtan helyezkednek el, és elsősorban külső ingerek – hideg, fokozott fizikai aktivitás, PPAR γ -agonisták jelenléte vagy szöveti sérülés – hatására differenciálódnak. E sejtek képesek alkalmazkodni a különböző környezeti változásokhoz: stimuláció hiányában az úgynevezett mitofágia révén fehér morfolófiájú, inaktív állapotba kerülnek, alacsony UCP1 expresszióval és egyetlen nagy lipidcseppel. Fejlődéstanilag a barna zsírszövet sejtjei miogén eredetű prekurzorokból származnak, amelyek olyan transzkripciós faktorokat expresszálnak, mint a Myf5, a Pax7 vagy a PRDM16. A bézs adipociták viszont más progenitor populációkból erednek (pl. SMA+, PDGFR α +, PDGFR β + sejtek), amelyek esetében elsősorban a környezeti hatások határozzák meg a differenciáció folyamatát.

1.2. Az adipociták hőtermelő mechanizmusai

A hőtermelő adipociták, beleértve a barna zsírszövet adipocitáit illetve a bézs adipocitákat, kulcsfontosságú szerepet játszanak a nem-didergéses hőtermelésben. A hőtermelés kétféle módon történhet: UCP1-függően és UCP1-függetlenül. Az UCP1, amely a mitokondrium belső membránjában található, a termogenikus adipociták kulcsfontosságú fehérjéje, mivel képes a tápanyagok metabolizmusát szétválasztani az ATP szintézistől. Az UCP1 aktiválása a szimpatikus idegrendszer hatására megy végbe, amely során a noradrenalin aktiválja az adrenerg receptorokat (AR-eket), ezáltal fokozza a lipolízist és elősegíti a hőtermelést. Az UCP1 mellett más metabolikus szubsztrátok, mint a glükóz, zsírsavak és aminosavak is szerepet játszanak a citromsavciklus fenntartásában, ezzel elősegítve a NADH és a FADH₂ képződését, melyek az elektrontranszport láncban hasznosulnak. A barna zsírszövet hideg hatására hasznosítja az elágazó-láncú aminosavakat, amelyek növelik a NADH termelést és ezáltal elősegítik a hőtermelést.

Számos tanulmányban kimutatták, hogy léteznek UCP1-független hőtermelő mechanizmusok is, mint például a kalcium, a kreatin-függő szubsztrát és a TAG ciklusok, amelyek képesek hőtermelést biztosítani UCP1 jelenléte nélkül is. A kreatin mediálta hőtermelés a kreatin cikluson keresztül valósul meg, amely a kreatin foszforilációs/de-foszforilációs folyamatát jelenti, amelyet az ATP szintézis hajt. Ez a mechanizmus két kulcsfontosságú mitokondriális fehérjét igényel: a kreatin-kináz B-t és a szövet-specifikus alkalikus foszfatazt. A kalciumciklus szintén fontos szerepet játszik a hőtermelésben, különösen a bézs adipociták esetében. A hideg hatására a szimpatikus idegek aktiválják az α 1-AR és β 3-AR receptorokat, melyek növelik a sejt belső kalciumszintjét. A kalcium ezután bejut a mitokondriumba, fokozva az ATP szintézist és a hőtermelést UCP1 nélkül. A másik jelentős hőtermelő mechanizmus a fehér zsírszövetben

zajló TAG-ok folyamatos hidrolizálása és újra-észterifikálása. Ez a ciklus ATP-t igényel, így ennek következményeként az energia hő formájában szabadul fel. A re-észterifikációs folyamat során a TAG-ok zsírsavakra és glicerinre, vagy mono- és diacil-gliceridekre bomlanak, majd újra-észterifikálódnak, ezáltal hőt termelve. Végül, a *PM20D1* gén egy olyan enzimet kódol, amelyet elsősorban a barna és bézs adipociták expresszálnak, és amely jelentősen hozzájárul a hőtermeléshez. Az enzim fő feladata a zsírsavak, például az arachidonsav és oleinsav, aminosavakkal – különösen a fenilalaninnal – való konjugálása, amely N-acil-aminosavakat eredményez. Ezek a metabolitok közvetlenül befolyásolják a mitokondriális funkciókat és a hőtermelést. A *PM20D1* magas szintje fokozza a glükóz-háztartást és az energiafelhasználást, míg ennek hiányában glükóz intolerancia és inzulinrezisztencia megjelenése figyelhető meg. Kutatások arra is rámutattak, hogy a *PM20D1* fokozott expressziója javítja az energiaháztartást és mérsékli az elhízás kialakulását. A mitokondriális szétkapcsoló mechanizmusok körülbelül 20%-ban járulnak hozzá a teljes mitokondriális légzéshez, amely alátámasztja a hőtermelés fontosságát a szervezet teljes energiafelhasználásában.

1.3. A termogenikus adipociták aktiválásának lehetőségei

Az elmúlt években intenzív kutatások vizsgálták, hogyan serkenthető a hőtermelő zsírsejtek – elsősorban a barna és bézs adipociták – működése. A legismertebb aktiváló tényező az alacsony hőmérséklet, amely a szimpatikus idegrendszeren keresztül, noradrenalin segítségével fokozza az UCP1 fehérje expresszióját és ezáltal a hőtermelést. A rövid távú hideginger jelentős mértékben serkenti a barna zsírszövet növekedését, fokozza a glükózfelvételt és az oxidatív anyagcsere-folyamatokat. A rendszeres testmozgás barna zsírszövetre gyakorolt hatása emberben kevésbé egyértelmű, mint állatmodellekben, bizonyos izomeredetű molekulák – mint például az IL-6 vagy az irisin – elősegíthetik a mitokondriumok biogenezisét és a hőtermelő gének aktiválódását, elsősorban a fehér zsírszövetben. Ezek a változások hozzájárulhatnak az energiafelhasználás növekedéséhez és a metabolikus profil javulásához. A legújabb eredmények szerint a barna zsírszövet hormonális jelátvitelen keresztül kapcsolatba léphet a szívvel, és bizonyos körülmények között – például szívkárosodás esetén – protektív szerepet tölthet be.

Bizonyos természetes vegyületek – például a kapszaicinoidok, omega-3 zsírsavak és a koffein – szintén serkentik a hőtermelést. A kapszaicin és hasonló anyagok a bélrendszerben található TRPV1 receptorokon keresztül fokozzák az energiafelhasználást, a zsíroxidációt és a barna zsírszövet erezettségét. Az omega-3 zsírsavak, különösen az eikozapentaénsav, növelik a mitokondriális aktivitást, csökkentik a gyulladást és elősegítik az UCP1-függő hőtermelést. A

koffein már alacsony dózisban is képes aktiválni a barna és fehér zsírszövet hőtermelő folyamatait. Gyógyszeres megközelítések közül a β 3-adrenerg agonisták (mint a mirabegron) jelentős érdeklődést váltottak ki, mivel fokozzák a barna zsírszövet aktivitását, növelik az alapanyagcserét és a glükózfelhasználást. További készítmények, mint például a GLP-1 receptor agonisták és a mineralokortikoid-receptor blokkolók, szintén képesek elősegíteni a zsírszövet hőtermelő folyamatait, ezáltal javítani az anyagcserét.

1.4. A Simpson-Golabi-Behmel szindróma (SGBS) sejtek

Az *in vitro* adipocita modellek kulcsfontosságúak az adipogenezis szabályozásának és az adipokinek szekréciójának tanulmányozásában, amelyek alapvetően befolyásolják az inzulinérzékenységet és a szervezet anyagcserefolyamatait. Bár számos rágszáló- és humán zsírszövetből származó sejttypus áll rendelkezésre, ezek korlátozott proliferációs kapacitásuk miatt végesek, továbbá sok modell transzformált vagy tumoros eredetű, amely szintén befolyásolhatja az eredmények megbízhatóságát. Az egyik legelterjedtebb humán sejttes modell az SGBS sejt vonal, amely egy ritka, X-kromoszómához kötött túlzott növekedéssel járó betegségből származik. Az SGBS sejtek fokozott proliferációs és differenciációs képességgel rendelkeznek, képesek legalább 50 generáción át adipocitákká alakulni, miközben fenntartják az adipocita-specifikus gének stabil kifejeződését, valamint anyagcserefolyamataik (glükóztranszport, lipogenezis, lipolízis) hasonlóak a primer humán adipocitákéhoz. A fokozott proliferáció hátterében a sejtnövekedést serkentő és gátló mechanizmusok egyensúlyának felborulása áll, amely a sejtnövekedés gátlásának és az apoptózis szabályozásának defektusához vezet. Ezt részben a *glipikán-3* gén mutációja vagy delécioja okozhatja, amely egy sejt felszíni proteoglikánt kódol, és amely fontos szerepet játszik a szervnövekedés szabályozásában. Az SGBS sejtekben az olyan adipogén gének, mint az adiponektin, leptin, PPAR γ és C/EBP, expressziója 10–15-ször magasabb, mint a primer szubkután fehér adipocitákban, noha anyagcserejellemzőik ezektől eltérnek. Az SGBS sejt vonal tehát megbízható és sokoldalú modellként szolgál az humán adipociták funkcióinak vizsgálatára.

1.5. A B1-vitamin

A tiamin, vagy más néven B1-vitamin volt az első felfedezett B-vitamin, amelyet 1912-ben izoláltak. Vízben oldódó vitaminról van szó, amely a vizelettel ürül a szervezetből, így nem halmozódik fel és nem jár toxikus hatásokkal. A molekula szerkezete két heterociklusos gyűrűből épül fel: egy pirimidinből és egy tiazolból, amelyeket rövid metilén híd köt össze. A tiazolgyűrű pozitív töltése miatt maga a tiamin molekula is pozitív töltéssel rendelkezik. A

természetben, a növényekben leggyakrabban szabad formában található meg, míg az állati szövetekben döntően tiamin-difoszfátként (TDP-ként) fordul elő. Az elfogyasztott tiamin a szervezetben foszfatázok segítségével alakul át szabad formává, amelyet a sejtek fel tudnak venni. A sejtmembránon átjutva a tiamin a tiamin-pirofoszfokináz-1 (TPK1) enzim révén alakul át tiamin-pirofoszfáttá (TPP-vé), amely a vitamin egyik legfontosabb aktív formája. A szervezetben ezen kívül előfordulhat tiamin-monofoszfát (TMP), tiamin-difoszfát (TDP) és tiamin-trifoszfát (TTP) formájában is.

A TPP a legismertebb forma, amely számos enzim működéséhez elengedhetetlen kofaktorként szolgál. Ilyen enzimek többek között a piruvát-dehidrogenáz (PDH) komplex, amely a glikolízist köti össze a citrátkörrel, az α -ketoglutarát-dehidrogenáz (α -KGDH) komplex, amely a mitokondriális elektrontranszport-lánchoz kapcsolódik, valamint a transzketoláz enzim, amely a pentóz-foszfát útvonalban tölt be kulcsfontosságú szerepet, többek között a nukleinsavak szintéziséhez szükséges ribóz, valamint a NADPH termelésében, amely a zsírsavak és a szteroidok bioszintéziséhez elengedhetetlen. Emellett részt vesz a leucin, izoleucin és valin anyagcseréjében a BCKDH komplexen keresztül, amely az elágazó szénláncú aminosavak lebontásának sebességét szabályozza.

A napi tiamin-igény egy átlagos felnőtt esetében körülbelül 1,1–1,5 mg, azonban ez az érték módosulhat életkor, nem és fizikai aktivitás függvényében. A tiamin leginkább teljes kiőrlésű gabonafélékben, hüvelyesekben, diófélékben, barna rizsben és állati eredetű élelmiszerekben található meg. A táplálékból származó tiamin aktív transzport révén szívódik fel kisebb dózisban, míg nagyobb mennyiségben passzív diffúzióval is bejut a bélfalon keresztül a keringésbe. A felszívódott vitamin főként az agyban, a szívben, a májban és a vesében tárolódik. Biológiai felezési ideje rövid, körülbelül 12 óra, így folyamatosan pótolni kell. A szervezet tiamin raktárai gyorsan – akár 2–3 héten belül – kimerülhetnek, különösen olyan állapotokban, amelyek felgyorsítják az anyagcserét, például alkoholemegvonás, görcsrohamok, fertőzések, cukorbetegség vagy daganatos betegségek esetén, főleg, ha azok a gyomor-bél traktust vagy a vérképzőrendszert érintik.

Tiamin-hiány kialakulásához több tényező vezethet. Elégtelen bevétel gyakran társul alkoholizmushoz, alultápláltsághoz vagy bariátriai sebészeti beavatkozásokhoz. Emellett különféle felszívódási zavarok, például hányás, malnutríció vagy malabszorpciós szindróma is okozhatják a hiányállapotot. A vitamin fokozott ürülése szintén hozzájárulhat a kimerüléshez, ilyen lehet hasmenés, hányás, hemodialízis, vízhajtók alkalmazása, fertőzések vagy szepszis. További rizikót jelenthet a megnövekedett igény, például terhesség, szoptatás, fokozott enzimaktivitás vagy hipertireózis esetén.

A hosszabb ideig fennálló tiamin-hiány súlyos neurológiai tünetekhez vezethet, mivel a TPP-t igénylő enzimek működése leáll. Ennek következtében elsősorban az idegrendszer működése károsodik. A PDH aktivitásának csökkenése fokozott laktát termeléshez vezet, amely növeli az oxidatív stresszt, mikrogliális elváltozásokat okozva. Továbbá a zsírsavak, nukleinsavak és szteroidok szintézisének gátlása demielinizációhoz, azaz az idegrostok védőburkának elvesztéséhez vezet. A tiamin nem csak enzimatikusan vesz részt a sejtfunkciók szabályozásában, hanem szerepet játszik a szinapszisok kialakulásában, az axonok növekedésének támogatásában, valamint a mielin termelés elősegítésében is. Fontos szerepe van az acetilkolin és a szerotonin szintézisében és visszavételének szabályozásában, különösen a kisagyban, a hippokampuszban és a hipotalamuszban.

A tiamin-hiány klasszikus következménye a beriberi, amelynek két formáját különböztetjük meg. A nedves beriberi a szív- és érrendszert érinti; ödémával, szívelégtelenséggel, súlyos esetekben infarktussal járhat. A száraz beriberi az idegrendszeri tünetekre koncentrálódik, például perifériás neuropátia és izomgyengeség formájában jelentkezik. Egy másik súlyos következmény a Wernicke-Korsakoff-szindróma, amely memóriazavarokat, ataxiát és gyakorta hipotermiát okoz. A szindróma során kimutatták a hipotalamusz károsodását, amely a testhőmérséklet és az étvágy szabályozásáért felelős. Több esettanulmány szerint a tiamin-pótlás már két napon belül visszafordította a hipotermiát. A tiamin-hiány anyagcserezavarokat is előidézhethet, különösen a szénhidrát-anyagcserében. Diabetes mellitus (DM) esetén megfigyelték, hogy a tiamin kiválasztása a vizelettel drámaian megnő – 24-szeresre 1-es típusú, és 16-szorosra 2-es típusú DM esetén. A vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a csökkent TDP-szint a vörösvértestek transzketoláz aktivitásának csökkenéséhez vezet. Klinikai vizsgálatok alapján napi 150 mg tiamin adása egy hónapon keresztül jelentős mértékben csökkentette az éhgyomri vércukorszintet olyan 2-es típusú cukorbetegknél, akik korábban nem részesültek gyógyszeres kezelésben. Emellett javultak a vérzsír- és kreatinin-szintek is. Más vizsgálatok szerint napi 300 mg tiamin hat héten keresztül történő alkalmazása javította a glükóztoleranciát hiperglikémiás pácienseknél.

A vitamin felszívódása után a véráramba kerül, ahol eritrociták, leukociták és vérlemezkék veszik fel, majd továbbítják a máj, a szívizom és az idegrendszeri sejtek felé. Az agyban a vér-agy gáton keresztül jut el az idegsejtekhez, elsősorban a cerebrospinális folyadékön át. A transzportban kulcsszerepet játszanak az oldott anyag transzporter (SLC) családba tartozó transzporterek, közülük is az SLC19 család. Ide tartozik a ThT1 (SLC19A2), a ThT2 (SLC19A3), valamint a redukált folát-szállító (RFC, SLC19A1), amely TMP, TDP és TTP transzportját végzi kifelé a sejtekből, fenntartva ezzel a vitamin-foszfátformák egyensúlyát. A

ThT1 és ThT2 csak tiamint szállít be a sejtekbe, nem képesek folát-kötésre. Egy másik fontos transzporter a mitokondriális membránban található TPP transzporter (TPC, SLC25A19), amely a PDH és α -KGDH működéséhez biztosítja a kofaktorokat.

Az *SLC19A2* gén egy 12 transzmembrán doménből álló fehérjét kódol, amely minden emberi szövetben expresszálódik. Bár a géntermék N-glikozilációs helyeket tartalmaz, ezek nem szükségesek a működéshez. A szállítás tiamin/H⁺ antiport mechanizmussal történik, rendkívül magas specificitással, más szerves kationokat nem ismer fel. Az *SLC19A2* gén hat exont tartalmaz, és kimutatták, hogy kiütése egerekben DM-et, halláskárosodást és megaloblasztos vérképet eredményez tiamin-szegény étrenden. Emberekben ezen gén mutációja tiamin-érzékeny megaloblasztos anémiát (Rogers-szindróma) okoz, amely hatékonyan kezelhető tiamin-pótlással. Az *SLC19A3* gén hasonló szerkezetű és funkciójú. Tiamin antagonisták – mint például az amprolium, egy szerkezeti analóg – lehetőséget biztosítanak a vitamin hatásmechanizmusának vizsgálatára. Ezen antagonisták, illetve ThT-inhibitorok vizsgálatát leggyakrabban a CACO2 bélhámsejt-vonalon végzik. A fedratinib például jelentősen erősebben gátolja a ThT2-t (IC₅₀ = 1,36 μ M), mint a ThT1-et (IC₅₀ = 7,10 μ M), ami új távlatokat nyithat a farmakológiai kutatásokban.

2. CÉLKITÜZÉSEK

Humán primer nyaki területről származó adipociták termogenikus aktivitásának vizsgálata hosszú távú tiamin-kezelés hatására

A kutatás célja a tiamin hosszú távú és fokozatosan emelkedő koncentrációi hatásának feltérképezése a humán nyaki adipociták termogén aktivitására. Az oxigénfogyasztás mérésével és az UCP1 expressziójának vizsgálatával az adipociták hőtermelő képességét vizsgáltuk. Kutatásunk célja a tiamin hatásának tisztázása a hőtermelő mechanizmusok szintjén, különösen a mitokondriális működés szempontjából.

- Vizsgálataink során figyelemmel kísértük a mitokondriális komplex alegységek expresszióját is, hogy megértsük, miként befolyásolják a különböző tiamin koncentrációk a mitokondriális funkciókat, ezáltal a hőtermelő kapacitást.
- A ThT-k és a termogén, valamint a barnulási markerek kifejeződését is vizsgáltuk, annak érdekében, hogy megértsük a tiamin hatását a hőtermelésre és az adipociták barnulására.

Rövid távú tiaminnal történő kezelés és a tiamin transzporterek gátlásának hatása az SGBS adipociták termogenezésére

Az SGBS sejtvonal esetében a kutatás célja annak vizsgálata volt, hogy miként befolyásolja a hőtermelő folyamatokat a tiaminnal történő rövid távú kezelés, valamint a transzporterek gátlása.

- A dibutiril (db)-cAMP által kiváltott adrenerg stimulációval kombináltan vizsgáltuk, hogy a tiamin koncentrációjának növekedése, illetve a transzporterek gátlása miként befolyásolja az SGBS adipociták oxigénfogyasztását és hőtermelését, különös tekintettel az UCP1 aktivitásra.
- Kísérleteink egyik célja a mitokondriális komplex alegységek expressziójának vizsgálata volt, annak érdekében, hogy vizsgáljuk, miként befolyásolja a tiaminnal történő kezelés és a transzporterek gátlása a mitokondriális folyamatokat.
- Vizsgáltuk továbbá, hogy hogyan befolyásolja a transzporterek működésének gátlása, valamint a tiaminnal történő kezelés a hőtermelésben részt vevő gének és a barnulási markerek expresszióját.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A zsírszövet minták eredete és etikai engedélyek

Vizsgálatainkhoz nyaki szubkután és mély nyaki, pajzsmirigy sebészeti beavatkozásból származó zsírszöveteket használtunk. A donor betegek megfelelő tájékoztatás után írásos beleegyezésüket adták a mintavételhez. Ezen humán eredetű sejteken végzett kísérleteinket a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek megfelelően végeztük. A kutatási tervet elfogadta az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (No. 20571-2/2017/EKU), valamint a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága (No. 3186-2010/DEOEC RKEB/IKEB; No. 4734-2017/DE RKEB/IKEB).

3.2. Mintagyűjtés és a humán szubkután, valamint mély nyaki zsírszövetből származó adipocita-eredetű stromális sejtek (hASC-k) izolálása

A donorok közötti egyedi variabilitás minimalizálása érdekében szubkután és mély nyaki zsírszöveti biopsziákat gyűjtöttünk olyan páciensektől, akik elektív pajzsmirigyműtéten estek át. A minták 20–65 év közötti, 29,9 alatti testtömegindex értékeket mutató egyénekből származtak. A beválasztási kritériumokat kizárólag a testtömeg-index alapján határoztuk meg, a nemi megoszlás nem képezte a szelekció alapját. A vizsgálatból kizárásra kerültek azon egyének, akiknél a műtét időpontjában kóros pajzsmirigy-hormonprofil, ismert DM, illetve malignus daganat állt fenn. A zsírszöveti mintákat a műtétet követően azonnal a laboratóriumba szállítottuk és feldolgoztuk. A feldolgozás során a zsírszövetet apró darabokra vágtuk, eltávolítottuk a kötőszöveti és vaszkuláris komponenseket, majd a tisztított mintákat 15 mL-es centrifugacsövekbe helyeztük. Az emésztéshez a szövetdarabokat 120 U/mL *Clostridium histolyticum* kollagenázt tartalmazó, steril 1× foszfátpufferes sóoldatban (PBS-ben) 37 °C-on, vízfürdőben inkubáltuk 60 percen keresztül. Az emésztés során 15 percenként óvatosan felráztuk a csöveket a homogenitás biztosítása érdekében. A szöveti törmelék eltávolításához a sejtszuspenziót 140 µm pórusméretű szűrőn szűrtük át, majd a mintákat 200 g mellett 10 percen keresztül centrifugáltuk. A kapott stromális-vaszkuláris frakciót DMEM/F12-HAM táptalajban újrászuszpendáltuk, melyet 10% főtális borjúsérum, 100 U/mL penicillin-sztreptomycin, 33 µM biotin és 17 µM pantoténsav egészített ki. A hASC-eket 15 000 sejt/cm² sűrűségben szélesztettük nyolc-lyukú Ibidi µ-plateken vagy 6-lyukú plateken, majd 24 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében, sérumot tartalmazó tápközegben az adhézió elősegítése érdekében. Ezt követően az adhéziót nem mutató, lebegő sejteket PBS-sel eltávolítottuk, és a tapadó hASC-eket tovább tenyésztettük a kívánt konfluencia eléréséig. A sejtenyészetek esetleges mycoplasma kontaminációját polimeráz láncreakcióval (PCR) ellenőriztük.

3.3. A hASC-k és az SGBS preadipociták differenciálása érett fehér, valamint bézs adipocitákká

A differenciáltatáshoz hASC, valamint SGBS preadipocitákat használtunk. Fehér adipocita differenciáció során három napig a következő médiumban tenyésztettük a sejteket: DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 10 μ g/ml apo-transzferrin + 20 nM inzulin + 100 nM kortizol + 0,2 nM T3 + 2 μ M roziglitazon + 25 nM dexametazon + 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX). Bézs adipocita differenciáltatás során az alábbi médiumban tenyésztettük a sejteket: DMEM-F12 + 33 μ M biotin + 17 μ M pantoténsav + 10 μ g/ml apo-transzferrin + 850 nM inzulin + 0,2 nM T3 + 1 μ M dexametazon + 0,5 mM IBMX. A harmadik napot követően az IBMX-et és a dexametazont elhagytuk, majd 500 nM roziglitazont adtunk a bézs adipocita differenciációs tápfolyadékhoz. A differenciáció negyedik napjától mindkét esetben elhagytuk a dexametazont és az IBMX-et a táptalajból. A fehér differenciációs protokollban a hidrokortizon jelenléte a 4–14. nap között folyamatosan jelen volt. A bézs differenciációs médium 4–14. nap között roziglitazont, valamint emelt koncentrációjú inzulint tartalmazott.

3.4. Az adipociták kezelése a differenciáció alatt és után

A hASC-k differenciáltatása során a tiamin különböző koncentrációinak hatását vizsgáltuk, melynek során a differenciáció harmadik napjától a tizennegyedik napig alkalmaztunk többlet vagy fokozatosan növekvő koncentrációjú tiamint. A „többlet tiamin” kísérletek esetében a differenciáció utolsó 11 napjában a sejteket DMEM/F12-HAM tápfolyadékban differenciáltuk, amelyhez 25 000 nM vagy 50 000 nM koncentrációban tiamin-hidrokloridot adtunk. A kontroll sejtek kizárólag a táptalajban alapvetően jelenlévő, 6400 nM koncentrációjú tiamin jelenlétében kerültek differenciáltatásra a teljes differenciációs periódus alatt. A tiamin koncentráció-függés vizsgálatához speciálisan előállított, tiamin-mentes médiumot alkalmaztunk, amelyhez a differenciáció utolsó 11 napjában fokozatosan növekvő koncentrációkban (40 nM, 200 nM, 1000 nM, 5000 nM vagy 25 000 nM) tiamin-hidrokloridot adtunk. Ezekben a kísérletekben a kontroll sejtek a teljes differenciáció során tiamin-mentes közegben voltak differenciáltatva. A differenciációs folyamat végén a sejteket TRIzol vagy nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldatban lizáltuk a további vizsgálatokhoz.

A differenciált SGBS adipociták esetében, amelyeket DMEM/F12-HAM tápfolyadékban tenyésztettünk, az érett fehér és bézs adipocitákat 0,5 mM koncentrációjú, egyszeri, 10 órás db-cAMP kezelésben részesítettük, az *in vivo* hideg indukálta termogenezis modellezése céljából. Emellett a tiamin transzporterek gátlása érdekében Fedratinibet (1 μ M) vagy Amproliumot (300 μ M) alkalmaztunk szintén 10 órás időtartamban. A db-cAMP kezelést kombinációban is

alkalmaztuk az inhibitorokkal, szintén 10 órán keresztül. A többlet tiamin hatásának vizsgálata során az SGBS sejteket DMEM/F12-HAM médiumban differenciáltattuk fehér és bézs irányba, amely sejteket a differenciáció lejártaát követően tiamin-hidroklorid hozzáadásával (25 000 nM vagy 50 000 nM) vagy anélkül, 10 óráig kezeltünk. Ezekben az esetekben a kontroll sejtek ismételtén csak a DMEM/F12-HAM tápfolyadékban jelen lévő tiamin mellett kerültek kezelésre. A kezeléseket követően a sejteket TRIzol vagy SDS oldatban lizáltuk a további kísérletek céljából. Minden kísérleti körülmény esetén a hASC és SGBS adipocitákat 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú inkubátorban tenyésztettük, a táptalaj cseréjét pedig háromnaponta végeztük.

3.5. Nyilvánosan elérhető egyedi sejtmagi RNS-szekvenálási (snRNA-seq) adatok elemzése

A rendelkezésre álló snRNA-seq adatkészletet a Sun és munkatársai (2020) által leírtaknak megfelelően egy nyilvános weboldalon található program (<https://batnetwork.org/>) segítségével elemeztük.

3.6. Teljes RNS izolálása és TaqMan™ reverz transzkripcióval kapcsolt kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A sejtek TRIzol reagensben történő összegyűjtését követően a teljes RNS-t kloroform–izopropanol extrakcióval izoláltuk. Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát DNáz kezelést követően Nanodrop 2000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Az RNS-t minden mintánál 100 ng/μL koncentrációra hígítottuk, majd a reverz transzkripciót a gyártó utasításai szerint végrehajtva cDNS-é írtuk át. A kvantitatív PCR során alkalmazott validált TaqMan próbákat a Thermo Fisher Scientific biztosította. A qPCR-t Light Cycler® 480 II készüléken végeztük. A reakciókörülményeket a következőképpen állítottuk be: kezdeti denaturáció 95 °C-on 1 percig, majd 50 ciklus 95 °C-on 12 másodpercig és 60 °C-on 30 másodpercig. A gének normalizált expressziós szintjét a Ct módszerrel számítottuk ki. A ΔC_t érték a célgén C_t értéke mínusz a belső kontrollként használt *ACTB* és *GAPDH* gének átlagának C_t értéke. A normalizált génexpressziót a $2^{-\Delta C_t}$ képlet alapján határoztuk meg.

3.7. Immunblottolás

A differenciált primer és SGBS adipociták esetében a sejteket hideg, steril 1× PBS-sel mostuk, majd SDS pufferben gyűjtöttük. A mintákat 100 °C-on 10 percig forraltuk, majd SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét. A fehérjéket PVDF Immobilon-P transzfermembránra vittük át, ezt követően a membránokat 1 órán keresztül Tris-pufferolt sóoldatban (TBS), 0,05%

Tween-20-t (TTBS) és zsírszegény tejport tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk. A membránokat egy éjszakán át történő inkubálás során 4 °C-on, specifikus hígítású elsődleges ellenanyagokkal kezeltük. Ezt követően a membránokat TTBS-ben háromszor, egyenként 15 percig mostuk, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten HRP-konjugált, fajspecifikus másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Az immunreakciók kimutatását Immobilon kemilumineszcens szubsztráttal végeztük. Az immunblotok kvantifikálását FIJI ImageJ szoftverrel végeztük; a célfehérje optikai denzitását a normalizáló fehérje (tubulin vagy aktin) denzitás értékéhez viszonyítva normalizáltuk.

3.8. Oxigénfogyasztási ráta és extracelluláris acidifikációs ráta mérése Seahorse készülékkel

A 3.3. pont szerint differenciált hASC-eredetű és SGBS adipociták oxigénfogyasztását és extracelluláris acidifikációs rátáját XF96 Seahorse oximéterrel mértük, korábban optimalizált protokollok alapján. Azokban a kísérletekben, ahol a hASC-ket többlet tiamin jelenlétében differenciáltuk, a sejteket 1 órás előinkubálást követően 6400 nM tiamint tartalmazó Agilent Seahorse XF Base Medium médiumban kezeltük. Abban az esetben, amikor a differenciáltatás fiziológiás plazmaszinthez közeli tiamin koncentrációk mellett zajlott, a méréseket tiamin-mentes médiumban végeztük, így az extracelluláris acidifikációs ráta mérése nem volt kivitelezhető a puffer jelenléte miatt. Mindkét beállításban a kiindulási oxigénfogyasztási ráta rögzítése után 0,5 mM db-cAMP-t adtunk a sejtekhez az adrenerg válasz szimulálására, majd az indukált oxigénfogyasztási rátát 20 percenként rögzítettük.

A differenciált SGBS adipociták esetében az alap oxigénfogyasztási ráta mérése után 0,5 mM db-cAMP, 1 μ M Fedratinib, 300 μ M Amprolium, vagy ezek kombinációját adtuk a sejtekhez, majd az indukált oxigénfogyasztási rátát 30 percenként mértük. A többlet tiamin hatásának vizsgálata során az SGBS preadipociták normál körülmények között kerültek differenciáltatásra fehér és bézs irányba, majd 0,5 mM db-cAMP injektálását követően 10 órán keresztül detektáltuk az oxigénfogyasztást tiamin jelenlétében (25 000 nM vagy 50 000 nM) vagy annak hiányában. Minden kísérleti körülményben a protoncsorgásos légzést 2 μ M oligomycin injektálása után detektáltuk. Az alapvonal korrekciója érdekében a sejtek egy egyszeri 10 μ M-os Antimycin A kezelést kaptak, mellyel mértük a nem-mitokondriális légzést. A mérések után az oxigénfogyasztás mértékét a lyukankénti fehérjetartalomra – melyet Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával határoztunk meg – normalizáltuk.

3.9. Az adipocita differenciációs arány meghatározása lézer-pásztázó citometria alkalmazásával

A szubkután és mély nyaki zsírszövetből származó hASC-ket 8 részes Ibidi μ -plateken szélesztettük majd differenciáltuk. A sejteket PBS-sel történő mosást követően 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk. Permeabilizálás 0,1%-os szaponinnal, majd blokkolás 5%-os zsírszegény tej oldattal történt a korábban leírtak szerint. A sejteket éjszakán át, szobahőmérsékleten anti-UCP1 elsődleges ellenanyaggal (1:200, U6382) inkubáltuk. Ezt követően 3 órán keresztül Alexa 488-konjugált kecske anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal (1:1000, A11034) kezeltük. A sejtmagokat propidium-jodiddal (1,5 μ g/mL, 1 óra) festettük. A szkennelést iCys Research Imaging Cytometer készülékkel végeztük. A képeket (n=4, 2000 sejt/minta) a CellProfiler és a CellProfiler Analyst szoftverekkel fél-automatizált módon elemeztük. A sejtek azonosítása a sejtmagfestés alapján történt, majd minden sejt esetében kvantifikáltuk az UCP1 immunfestés fluoreszcenciaintenzitását és a lipidcseppek fényszóródási textúraösszeg varianciáját. Az egyedi sejtek fluoreszcens és szóródási jellemzői alapján a differenciált adipociták és az előalakjaik osztályozását és számosságát a CellProfiler Analyst “Fast Gentle Boosting” gépi tanulási algoritmus végezte. A képeket Dr. Bacsó Zsolt (DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) elemezte.

3.10. Statisztikai analízis

Az eredményeket átlag $\pm$ szórás formájában adtuk meg. Az adatok eloszlásának normalitását Shapiro–Wilk próbával vizsgáltuk. Több csoport összehasonlítása során egy- vagy kétutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, Tukey-féle *post hoc* teszttel. Az adatok ábrázolását és statisztikai elemzését a GraphPad Prism 8 szoftverrel végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az extracelluláris tiamin koncentrációja befolyásolja a nyaki területről származó humán adipociták hőtermelő kapacitását

4.1.1. A többlet tiamin jelenléte az adipogenezis során fokozza a tiamintranszporterek expresszióját

Korábbi vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a ThT-k fokozott expressziója és a megnövekedett tiamin beáramlás elősegítette a nyaki területről származó adipociták hőtermelésének hatékony aktivációját. Elsőként a többlet (25 000 nM vagy 50 000 nM) tiamin hatását vizsgáltuk a transzporterek expressziójára olyan szubkután és mély nyaki eredetű adipocitákban, amelyeket standard adipogén differenciációs médiumban fehér, illetve hosszú távú roziglitazon-kezeléssel fokozott hőtermelő tulajdonságú bézs adipocitákká differenciáltattunk. Az adipocitákat standard körülmények között differenciáltattuk fehér vagy bézs zsírsejteké, a médium 6400 nM tiamin koncentrációja mellett, illetve további tiamin-hidroklorid hozzáadásával. A fehér adipociták differenciációs arányát nem befolyásolta az extracelluláris tiamin mennyisége. Megfigyeltük, hogy a ThT2 expressziója — ellentétben a ThT1-ével — magasabb volt mind mRNS, mind fehérjeszinten mély nyaki eredetű fehér adipocitákban, szemben a szubkután eredetűekkel. A különböző tiamin koncentrációk alkalmazása során a 25 000 nM-os kezelés jelentősen növelte a ThT1 expresszióját a szubkután eredetű bézs adipocitákban, míg a mély nyakiak esetén a 25 000 nM és 50 000 nM koncentrációk hasonló mértékű fokozó hatást fejtettek ki. Ezen kívül az 50 000 nM tiamin kezelés szignifikánsan növelte a ThT2 mRNS expresszióját mély nyaki eredetű bézs zsírsejtekben. Fehérjeszinten a ThT2 expressziója jelentős mértékben emelkedett, ha szubkután eredetű bézs adipocitákat 25 000 nM tiamin jelenlétében differenciáltunk, ugyanakkor a ThT1 fehérjeszintű expresszióját nem befolyásolta számottevően a nagyobb tiamin koncentráció.

4.1.2. A fokozatosan növekvő tiamin koncentrációk az adipogenezis során fokozzák a tiamintranszporterek expresszióját

További kísérletekben vizsgáltuk, hogy a fokozatosan növelt (40 nM, 200 nM, 1000 nM, illetve 5000 nM) tiamin koncentrációk milyen hatással vannak a ThT-k expressziójára a szubkután és a mély nyaki eredetű humán adipociták differenciálódása során. Ezeket a sejteket tiamin-mentes (Th 0) közegben differenciáltuk fehér vagy bézs sejtekké, illetve az említett tiamin koncentrációk fokozatos hozzáadásával. A tiamin jelenléte nem befolyásolta a fehér adipociták differenciációs arányát. Azonban az 1000 nM és 5000 nM tiamin jelenléte jelentős hatást váltott

ki, szemben a Th 0 és 40 nM tiamin mellett differenciált sejtekhez képest. Mindkét ThT mRNS-expressziója koncentráció-függően növekedett a tiamin jelenlétével párhuzamosan.

4.1.3. A tiamin jelenléte koncentráció-függő módon befolyásolja az adipociták hőtermelő képességét a differenciáció során

Vizsgáltuk, hogy a tiamin elérhetősége miként befolyásolja a fehér adipociták hőtermelő kapacitását, ha tiamin-mentes közegben vagy különböző koncentrációjú (40 nM–25 000 nM) tiamin jelenlétében differenciálódtak. A db-cAMP, amely egy sejtporomeábilis cAMP-analóg, szignifikánsan növelte a mitokondriális légzést. A tiamin-koncentráció növekedésével (40 nM-tól 25 000 nM-ig) arányosan emelkedett a bazális légzés, a maximális cAMP-stimulált légzés, valamint a stimulált protoncsorgós légzés, különösen a mély nyaki eredetű adipociták esetén. Szubkután fehér zsírsejtekben már 200 nM tiamin mellett is szignifikáns különbségeket észleltünk. A tiamin jelenléte nem befolyásolta az oligomicinnel gátolt, ATP-függő légzést egyik sejt típus esetében sem.

4.1.4. A mitokondriális biogenezist szignifikánsan befolyásolja a tiamin elérhetősége a nyaki eredetű adipociták differenciációja során

Szubkután eredetű fehér adipocitákban, amelyek fokozatosan növekvő tiamin-koncentrációk mellett differenciálódtak, az I., II. és III. mitokondriális komplex alegységek fehérjeexpressziója emelkedést mutatott. Az 1000 nM és 5000 nM tiamin kezelés statisztikailag szignifikáns növekedést okozott a 40 nM tiaminhoz vagy Th 0 koncentrációhoz képest. Ugyanakkor a IV. és V. komplex alegységének expressziója nem változott jelentősen. A mély nyaki eredetű zsírsejtekben — amelyek már eleve magas mitokondriális komplex fehérjeexpressziót mutattak — csak a II. komplex alegységének expresszióját befolyásolta a tiamin jelenléte.

4.1.5. A termogénikus gének expressziója fokozódik a tiamin koncentrációjának emelésével az adipociták differenciációja során

Mivel az emelkedett tiamin koncentráció arányosan növelte a mitokondriális légzést, különösen a stimulált protoncsorgós légzést, vizsgáltuk a termogenezissel összefüggő gének expresszióját is. Az *UCP1* és *PGC1A* mRNS-expressziója mind szubkután mind mély nyaki eredetű adipocitákban koncentráció-függően emelkedett. Az UCP1 fehérje szintje is hasonló mintázatot mutatott, míg a PGC1A fehérje szintjét nem befolyásolta számottevően a tiamin jelenléte. A fehér zsírsejt marker *LEP* expresszióját, valamint több termogén gént (*DIO2*, *TBX1*,

CKMT2, *CIDEA*) is vizsgáltunk. E gének expressziója is koncentráció-függően emelkedett. Ugyanakkor a *CITED1* kifejeződése mind Th 0, mind a magas tiamin koncentrációk mellett csökkent, és 40 nM tiamin mellett volt a legmagasabb.

4.1.6. A kapcsolt és a nem kapcsolt respirációt egyaránt fokozza az adipocita differenciáció során alkalmazott nagymennyiségű tiamin

Ezt követően a szubkután és a mély nyaki zsírszövetből származó adipociták termogenezisét vizsgáltuk olyan körülmények között, amikor a standard adipocita differenciációs médiumhoz (amely már alapvetően tartalmazott 6400 nM tiamin-hidrokloridot) többlet tiamint adtunk. A bazális légzés szignifikánsan magasabb volt azokban a szubkután fehér adipocitákban, amelyeket 25 000 nM extra tiamin jelenlétében differenciáltattunk, összehasonlítva a standard közegben differenciáltatott sejtekével. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a mély nyaki eredetű adipociták esetében is, azonban itt a különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak. Mind szubkután, mind mély nyaki eredetű adipociták esetében magasabb maximális cAMP-indukált respirációt detektáltunk, ha az adipocita differenciációs médium extra tiamint tartalmazott. Amikor a sejtek extra tiamin jelenlétében differenciálódtak, a protoncsorgásos és ATP-függő légzés is magasabb volt mind a szubkután, mind a mély nyaki eredetű adipocitákban. A db-cAMP stimulálta ATP-függő és protoncsorgásos légzés emelkedett, különösen a mély nyaki eredetű adipocitákban. Az aktivált fehér adipociták vizsgálata során a szubkután eredetű adipociták esetében a differenciációs folyamat alatt alkalmazott nagymennyiségű tiamin szignifikánsan befolyásolta a protoncsorgásos légzés értékeit. A stimulált ATP-függő respiráció nagyobb volt a többlet tiamin jelenlétében differenciáltatott mély nyaki adipocitákban. Az extracelluláris acidifikáció mértéke db-cAMP hatására emelkedett mind szubkután, mind mély nyaki eredetű adipocitákban, azonban az adipocita differenciáció során alkalmazott nagymennyiségű tiamin nem befolyásolta számottevően ezen paramétereket. A szubkután eredetű fehér zsírsejtekben a 25 000 nM vagy 50 000 nM tiaminnal történő kezelés jelentősen fokozta az I., II. és IV. mitokondriális komplex alegységének fehérjeszintjét, míg a mély nyaki eredetű adipocitákban az 50 000 nM tiamin fokozta az I. komplex alegység expresszióját.

4.1.7. A magas tiaminszintek az adipocita differenciáció során fokozzák a termogenikus gének expresszióját

Feltételezésünk szerint az adipocita differenciáció során alkalmazott többlet tiamin tovább fokozhatja a termogenezissel és a mitokondriális biogenezissel összefüggő gének expresszióját,

figyelembe véve, hogy a nagymennyiségű tiamin fokozta a protoncsorgásos légzést. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az extra tiamin fokozta mind az *UCP1*, mind a *PGC1A* mRNS expresszióját a fehér és bézs kontroll adipocitákhoz képest. Azonban a mély nyaki eredetű fehér és bézs adipocitákban az *UCP1* expresszió változása statisztikailag nem volt szignifikáns. Mindkét marker esetében az 50 000 nM koncentrációjú tiamin a sejtek anatómiai eredetétől függetlenül magasabb szintű génexpressziót eredményezett. Az mRNS adatokkal megegyezően, az UCP1 fehérjeexpressziója fokozódott, a többlet tiamin jelenlétében differenciáltatott bézs adipocitákban. A PGC1A esetében a szubkután eredetű bézs adipocitákban emelkedett expresszió volt megfigyelhető, amelyet az 50 000 nM tiamin tovább fokozott.

4.1.8. A nyaki régióból származó adipociták differenciációja során adagolt többlet tiamin fokozza a barna/bézs marker és termogén gének expresszióját

Ezt követően vizsgáltuk a *CKMT2*, *CIDEA*, *DIO2*, *TBX1*, *CITED1* és *LEP* gének mRNS-szintjeit a differenciációs médiumhoz adott extra tiamin hatására. A fehér zsírszöveti marker *LEP* kivételével a tiamin minden vizsgált gén expresszióját fokozta mind szubkután, mind mély nyaki eredetű bézs adipocitákban. A szubkután eredetű fehér adipocitákban a *CKMT2* és *TBX1* expressziója szignifikánsan emelkedett az alkalmazott többlet tiamin hatására, míg mély nyaki eredetű zsírsejtekben a *DIO2*, *TBX1* és *CITED1* expressziója fokozódott.

4.2. A tiamin jelentősége a humán adipociták termogenikus aktivitásában

4.2.1. A humán fehér zsírszövet adipocitái mutatják a legmagasabb-szintű tiamin transzporter expressziót

A nyilvánosan elérhető snRNA-seq adatok felhasználásával a ThT1 és ThT2 expressziós mintázatát vizsgáltuk a humán fehér zsírszövetben. A ThT1 főként a preadipocitákban és az adipocitákban fejeződött ki, míg a ThT2 kizárólag az érett adipocitákban volt jelen. Más sejttypusok, mint a fibroblasztok, endotélsejtek és CD4⁺ T-limfociták, nem mutattak kimutatható szintű ThT génexpressziót. A tiamin kulcsszerepet játszik a fehér zsírszövet működésében, különösen az adipociták barnulási folyamataiban és a hőtermelésben. A B1-vitamin jelentős szerepet tölt be a nyaki régióból származó, termogenezisre képes adipociták esetében, amit a ThT-k kifejezett sejt-specifikus klasztereződése is megerősített.

4.2.2. A tiamin transzporterek expressziója fokozódik az SGBS adipociták differenciálódása után történő adrenerg stimuláció és többlet tiaminnal való kezelés hatására

Korábban megállapítottuk, hogy a nyaki régióból származó hASC-k adipogenezise során alkalmazott nagymennyiségű tiamin fokozta a tiamin ThT-k expresszióját. Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogyan befolyásolja az extra tiamin (25 000 nM és 50 000 nM) az adipocita differenciálódás után a transzporterek alap- és db-cAMP-indukálta expresszióját az SGBS adipocitákban. A differenciált adipocitákat 0,5 mM db-cAMP-val kezeltük, extra tiamin jelenlétében vagy anélkül. Kezdetben megfigyeltük, hogy a db-cAMP-mediálta stimuláció jelentősen fokozta az *SLC19A2* mRNS-expresszióját mind fehér, mind bézs adipocitákban. Fehérjeszinten a db-cAMP-kezelés jelentősen növelte a ThT1 expresszióját a differenciált adipocitákban. A db-cAMP stimulált bézs adipociták esetében, a 25 000 nM tiamin jelenléte tovább fokozta a transzporter expresszióját. A differenciált adipociták 50 000 nM tiaminnal történő kezelése szignifikánsan növelte mind az alap-, mind a db-cAMP által indukált ThT1 fehérjeexpressziót. A bézs irányba differenciáltatott adipocitákban nem tapasztaltunk jelentős változást a ThT1 expressziója tekintetében. Az *SLC19A3* mRNS-expresszióját sem a db-cAMP-kezelés, sem az extra tiamin jelenléte nem befolyásolta jelentős mértékben. Hasonlóan, a ThT2 fehérjeexpressziója sem mutatott eltérést egyik kezelés esetén sem.

4.2.3. A tiamin transzporterek db-cAMP általi aktivációja csökken a transzporter inhibitorok jelenlétében

Ezután megvizsgáltuk, hogy a tiamin ThT-ket gátló fedratinib vagy amprolium adipogenezist követő alkalmazása befolyásolja-e a transzporterek alap, vagy db-cAMP által stimulált expresszióját fehér és bézs adipocitákban. A differenciált adipocitákat 0,5 mM db-cAMP-val kezeltük, ThT inhibitorok jelenlétében vagy anélkül. Megfigyeléseink szerint a db-cAMP stimuláció szignifikánsan fokozta mindkét ThT mRNS- és fehérjeszintjét fehér adipocitákban, míg a bézs adipocitákban ez a hatás kizárólag az mRNS-szintekre korlátozódott. A fedratinib jelentősen csökkentette a db-cAMP által indukált *SLC19A2* és *SLC19A3* mRNS-expresszióját mind fehér, mind bézs adipocitákban. Fehérjeszinten ez a gátló hatás kizárólag a db-cAMP-val kezelt bézs adipocitákban volt kimutatható mindkét transzporter esetében, míg a fehér adipocitákban csak a ThT2 expressziója csökkent. Az amproliummal történő kezelés szignifikánsan csökkentette mindkét transzporter mRNS-expresszióját a db-cAMP-val kezelt bézs adipocitákban; azonban fehérjeszinten ez a hatás kizárólag a ThT2 esetében volt megfigyelhető.

4.2.4. A tiamin transzporterek gátlása csökkenti a differenciált SGBS adipocitákban mind a kapcsolt, mind a szétkapcsolt légzést

Ezt követően vizsgáltuk a transzporterek lehetséges szerepét a differenciált SGBS adipociták termogenikus aktivációjában. A fehér és bézs adipocitákat db-cAMP-vel kezeltük a transzporterek inhibitorainak jelenlétében. Kezdetben rögzítettük a bazális oxigénfogyasztást, majd a db-cAMP injektálását követően meghatároztuk a maximális stimulált légzést. Ezt követően oligomicin injektálásával a protoncsorgásos légzést mértük, amely az UCP1 által közvetített termogenezissel hozható összefüggésbe. Az oxigénfogyasztás jelentősen növekedett db-cAMP-kezelés hatására mind fehér, mind bézs adipocitákban. Megfigyeltük, hogy a db-cAMP által kiváltott oxigénfogyasztást és protoncsorgásos légzés fokozódását mind a fedratinib, mind az amprolium szignifikánsan mérsékelte mindkét sejttípusban. Ezzel szemben a db-cAMP által indukált extracelluláris acidifikáció értékei változatlanok maradtak a transzporterek gátlásának hatására, mind fehér, mind bézs adipociták esetében.

4.2.5. A tiamin transzporterek gátlása az adipogenezis után csökkenti az SGBS adipociták mitokondriális biogenezisét

További vizsgálataink során vizsgáltuk a transzporterek inhibitorainak hatását, a mitokondriális komplex alegységeinek expressziójára. Eredményeink azt mutatták, hogy a db-cAMP által kiváltott aktiváció jelentősen fokozta az I., II., III. és IV. komplex alegységének expresszióját, míg az V. komplex expressziója változatlan maradt a fehér adipocitákban. Mind a fedratinib, mind az amprolium szignifikánsan gátolta az I. komplex alegységének db-cAMP-indukálta expresszióját. Az amprolium ezen felül csökkentette a III. és IV. komplexek alapszintű expresszióját, míg a fedratinib szelektíven csökkentette a IV. komplex alap szintjét. Emellett a fedratinib és az amprolium a mitokondriális II. komplex alegységének expresszióját is mérsékelte, azonban ez a csökkenés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

4.2.6. A tiamin transzporterek gátlása csökkenti a termogenikus markerek expresszióját a differenciált SGBS adipocitákban

Miután megfigyeltük az SGBS fehér adipociták csökkent termogén aktivitását a transzporter inhibitorok jelenlétében, tovább vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a transzporterek gátlása és ezzel a tiamin elérhetőségének korlátozása a termogenikus markerek expresszióját. Eredményeink alapján a db-cAMP fokozta az UCP1 mRNS- és fehérjeexpresszióját mind a fehér, mind a bézs adipocitákban. A fedratinib azonban gátolta ezt az emelkedett expressziót, kivéve a bézs adipocitákban, ahol az *UCP1* mRNS szintje nem változott. A fedratinib emellett

csökkentette a bézs adipociták UCP1 expresszióját mind mRNS-, mind fehérjeszinten. Az amprolium hasonlóan gátolta az UCP1 adrenerg-indukálta fehérjeexpresszióját a bézs és fehér adipocitákban. Továbbá, mindkét inhibitor csökkentette az *UCP1* mRNS szintjét a bézs adipocitákban, illetve a fehér adipocitákban fehérjeszinten. A fedratinib gátolta a db-cAMP által stimulált *PGC1A* expressziót mindkét sejttípusban, míg az amprolium hasonló hatást fejtett ki a bézs adipocitákban. Mindkét inhibitor kezelése a *PGC1A* expresszió csökkenését eredményezte fehérjeszinten mind a fehér, mind a bézs sejtekben db-cAMP stimulus mellett.

4.2.7. A tiamin transzporterek gátlása csökkenti a termogén markerek expresszióját a differenciált SGBS adipocitákban

Továbbá megvizsgáltuk, hogyan befolyásolják a ThT inhibitorok számos, a termogenezissel összefüggő gén mRNS expresszióját az SGBS fehér és bézs adipocitákban. Eredményeink szerint mindkét sejttípusban a db-cAMP kezelés jelentősen növelte a *CITED1*, *DIO2* és *TBX1* expresszióját, míg a *CIDEA* és *CKMT2* esetében ez a hatás csak a bézs adipocitákban volt megfigyelhető. A fedratinib mindkét sejttípusban jelentősen csökkentette ezen markerek db-cAMP által stimulált expresszióját.

4.2.8. A többlet tiamin jelenléte fokozza a kapcsolt és szétkapcsolt légzést adipogenezist követően

Korábban megfigyeltük, hogy a humán adipociták termogenikus potenciálja fokozódott az adipocita differenciáció során alkalmazott többlet tiamin hatására. E megfigyelések alapján célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk a rövidtávú többlet tiamin kezelés hatását a differenciált SGBS fehér és bézs adipociták termogén képességére, mind kezeletlen, mind db-cAMP-vel történő adrenerg stimuláció hatására. Mindkét típusú adipocita esetében megfigyeltük, hogy a 50 000 nM koncentrációjú extra tiamin jelentősen növelte az oxigénfogyasztást és az extracelluláris acidifikáció értékeit stimulálatlan körülmények között. Míg a plusz tiamin nem növelte tovább a db-cAMP által indukált emelkedést, megfigyeltük, hogy a db-cAMP a maximális stimulált oxigénfogyasztást, a protoncsorgásos légzést és az acidifikációt is fokozta mindkét sejttípusban a kezeltelenekhez képest, amely összhangban van korábbi megfigyeléseinkkel.

4.2.9. A nagymennyiségű tiamin az adipocita differenciáció során fokozza az SGBS adipociták mitokondriális biogenezisét

Ezt követően vizsgáltuk, hogy a nagymennyiségű tiammal történő kezelés az adipocita differenciációt követően miként befolyásolja a mitokondriális komplex alegységek expresszióját fehér adipocitákban. Megállapítottuk, hogy a db-cAMP kezelés jelentősen növelte az I., II., III. és IV. komplex alegységek fehérjeexpresszióját, míg az V. komplexre nem gyakorolt hatást, amely összhangban áll korábbi megfigyeléseinkkel. A 25 000 nM tiammal történő kezelést követően az I. és IV. komplex alegységek expressziója szignifikánsan fokozódott, míg a II., III. és V. komplexek esetében nem történt változás. További megfigyeléseink szerint az 50 000 nM tiamin kezelés jelentősen növelte az I., II., III. és IV. komplex alegységek fehérjeexpresszióját. A II. komplex fehérjeszintje nagymértékben emelkedett db-cAMP stimuláció hatására. Sem a tiamin, sem a db-cAMP nem befolyásolta az V. komplex alegységének expresszióját.

4.2.10. A fehér adipociták differenciációját követően az emelkedett tiaminszint fokozza a termogénikus markerek expresszióját

Miután megfigyeltük, hogy a magas tiaminszint fokozza a sejtlégzést, azt feltételeztük, hogy a differenciált SGBS adipocitákban alkalmazott többlet tiamin tovább növelheti a mitokondriális biogenezissel és termogenezissel kapcsolatos gének expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy a db-cAMP által stimulált *PGC1A* mRNS expresszió a fehér adipocitákban, valamint az *UCPI* expresszió a bézs adipocitákban tovább fokozódott a többlet tiamin hatására. A 25 000 nM tiamin növelte a *PGC1A* fehérjeszintjét kezeletlen fehér adipocitákban. Emellett az 50 000 nM tiamin fokozta a *PGC1A* mRNS expresszióját a bézs adipocitákban és a *PGC1A* fehérjeszintjét a fehér adipocitákban. Továbbá, az 50 000 nM tiamin növelte az *UCP1* fehérjeszintjét fehér adipocitákban db-cAMP kezelés hatására.

4.2.11. Többlet tiamin jelenlétében a barna/bézs markerek és a termogenezissel kapcsolatos gének expressziója is fokozódik a differenciált SGBS adipocitákban

Vizsgáltuk továbbá, hogy a fokozott tiaminbevitel hogyan befolyásolja más termogén markerek expresszióját. A db-cAMP stimuláció hatására a többlet tiamin növelte a *TBX1*, *DIO2* és *CIDEA* mRNS expresszióját fehér adipocitákban. Ezzel szemben a bézs adipocitákban a megnövekedett tiaminszint fokozta a *CKMT2*, *CITED1*, *DIO2* és *TBX1* mRNS expresszióját. Emellett megfigyeltük, hogy db-cAMP nélkül is emelkedett a *CITED1* és *DIO2* expressziója fehér adipocitákban, valamint a *CKMT2* és *CITED1* expressziója bézs adipocitákban.

5. DISZKUSSZIÓ

Korábbi kutatások során Tóth és munkatársai kilenc független donorból származó mély nyaki és szubkután zsírszövetből izolált hASC-kból differenciáltatott adipocita populációkat vizsgáltak. Az így nyert sejtek génexpressziós profilját RNS-szekvenálással elemezték, hogy feltárják azokat a molekuláris folyamatokat, amelyek a hőtermelés szabályozásáért felelősek. Az adipociták differenciációja során vagy hagyományos, vagy a barnulást elősegítő differenciációs médiumot alkalmaztak. Függetlenül attól, hogy melyik protokollt követték, a mély nyaki zsírszövetből származó sejtek jóval nagyobb arányban mutattak barna adipocita jelleget, valamint fokozott barnulási hajlamot, mint a szubkután eredetűek. Ezt megerősítették a BATLAS és ProFAT eredményei is. A vizsgálat során több olyan gént is azonosítottak, amelyek különböző SLC transzportereket kódolnak – ezek a membránfehérjék kulcsszerepet játszanak a sejtek tápanyagfelvételében és az energiaforgalom szabályozásában.

Mivel a barna és bézs adipociták kifejezetten energiaigényes sejtek, ezekben a tápanyagtranszporterek expressziójának fokozódása elengedhetetlen lehet az energiaellátás biztosításához. Külön figyelmet érdemel a ThT2 transzporter, amelyet az *SLC19A3* gén kódol: ennek szintje kifejezetten magasnak bizonyult a mély nyaki adipocitákban, különösen a differenciációt követően. Korábbi munkáink alapján a ThT2 szubsztrátja, a B1-vitamin magasabb koncentrációja szükséges volt ahhoz, hogy ezek a sejtek hatékonyan reagáljanak az adrenerg ingerekre, vagyis megfelelő hőtermelést produkáljanak. Ezt más vizsgálatok is alátámasztották, például egy friss publikáció, amely szerint a tiamin mellett a pantoténsav és a riboflavin is kulcsszerepet játszik abban, hogy humán bőr-eredetű fibroblasztok barna zsírsejtekké alakuljanak.

PhD munkám során arra kerestük a választ, hogyan befolyásolja a tiamin hozzáférhetősége a humán nyaki eredetű zsírsejtek differenciációját és hőtermelő képességét. A ThT2 szerepét már korábban is azonosították az emésztőrendszeri tiamin felszívódásban, valamint a teljes szervezet energiaháztartásának szabályozásában. Túlsúllyal küzdő egyének szubkután zsírszövetében például alacsonyabb ThT2 expressziót mértek, mint sovány kontrollok esetében, és a gén szintje pozitív korrelációt mutatott a testsúlycsökkenéssel, ami a metabolikus szabályozásban betöltött lehetséges szerepére utal. Állatkísérletek során kiderült, hogy a ThT2 képes részben helyettesíteni a ThT1 hiányát, mivel ThT2-deficiens egerekben jelentősen romlott a tiamin felszívódása, míg a ThT1 hiánya nem befolyásolta a plazmaszintet.

A kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a tiamin fokozatosan emelkedő koncentrációja egyértelműen növelte mind a ThT1, mind a ThT2 gén és fehérjeszintjét, akár mély nyaki, akár

szubkután eredetű adipociták esetén, függetlenül attól, hogy azok a hagyományos vagy a barnulást indukáló médiumban differenciálódtak. Bár a tiamin számos élelmiszerben megtalálható – többek között barna rizsben, teljes kiőrlésű gabonákban, hüvelyesekben vagy húsokban – a napi étrend mégsem feltétlenül biztosít elegendő mennyiséget a mikrotápanyagból. A felnőttek számára ajánlott napi tiaminbevitel férfiaknál 1,2 mg, nőknél 1,1 mg, viszont terhesség alatt ez az érték magasabb. A tiamin-hiány különösen az idegrendszert, a keringési rendszert és az emésztőrendszert érinti, és leggyakrabban akkor alakul ki, ha a bevitel nem kielégítő vagy ha fokozott a kiürülés – például alkoholizmus vagy alultápláltság következtében. Ilyen esetekben alakulhat ki a beriberi, illetve a Wernicke–Korsakoff-szindróma, amelynek jellemző tünetei a memóriazavar, koordinációs problémák és a gyakran jelentkező hipotermia. Egyes kutatások szerint a hipotermia hátterében a hipotalamuszban kialakuló elváltozások állnak, mivel ez az agyi terület felelős a testhőmérséklet szabályozásáért is. Klinikai tapasztalatok alapján a tiamin-hiány következtében kialakult alacsony testhőmérséklet már két napos pótlással is kezelhető.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a tiamin-hiányos környezetben differenciálódó humán mély nyaki eredetű adipociták lényegesen gyengébb termogenikus képességeket mutattak. Ez csökkent sejtlégzési szintben, alacsonyabb mértékű protoncsorgásos légzésben – amely az UCP1-függő hőtermelés egyik indikátora – valamint a termogenikus gének alacsonyabb expressziójában nyilvánult meg. Ezzel szemben a tiamin differenciáció alatti folyamatos pótlása egyértelműen javította ezeket a paramétereket, még hozzá koncentráció-függő módon. Minél magasabb tiaminszint állt rendelkezésre a sejtek differenciációja alatt, annál hatékonyabb volt a barnulási folyamat, és annál nagyobb mértékben expresszálódtak a hőtermelésért felelős markerek. Érdekesség, hogy bár a differenciációhoz használt médiumokban általában 10 000 nM körüli tiamin található, az emberi vérplazmában ennek töredéke, csak néhány nM-nyi mérhető.

Kísérleteinkben a differenciációs médiumhoz adott 25 000 nM tiamin jelentős mértékben fokozta az alap- és maximális légzést, valamint a protoncsorgásos légzést is – ez pedig a sejtek fokozott hőtermelő képességére utal. A magasabb tiaminszint emellett a mitokondriális elektrontranszportlánc egyes alegységeinek expresszióját is növelte. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a többlet tiamin jelenlétében differenciáltatott mély nyaki adipociták *ex vivo* körülmények között is intenzívebb termogenikus aktivitást mutattak. Mivel a barna és bézs zsírsejtek jelentős glükóz- és zsírsavfelvételi képességgel rendelkeznek, kulcsszerepet játszhatnak az elhízás és a 2-es típusú DM elleni küzdelemben. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a humán hASC-kból differenciáltatott barna adipociták egerekbe történő

transzplantációja fokozott glükózfelhasználást és energiafelhasználást eredményezett. Ennek ellenére a barnulási folyamat *in vivo* környezetben történő optimalizálása továbbra is kihívás. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a tiamin jelenléte a sejtek differenciációja során már önmagában is elegendő lehet ahhoz, hogy a differenciált adipociták fokozott hőtermelő képességet mutassanak még nyugalmi állapotban is.

Az SGBS sejtvonal egy kiválóan alkalmazható *in vitro* modellrendszert kínál, amely hasonlít a humán szubkután fehér zsírszöveti adipocitákhoz. A differenciált, érett SGBS adipociták több jellemzőjükben is megfelelnek a humán primer adipocitáknak, beleértve a barnulási képességet és az UCP1 expresszióját is. Ez a sejtvonal széles körben használatos a zsírszövet anyagcseréjének vizsgálatára, különösen az elhízás és a 2-es típusú DM patofiziológiájának modellezésére, kontrollált laboratóriumi körülmények között. A primer humán adipocitákból származó eredmények megerősítése érdekében nélkülözhetetlen a sejtvonal alapú rendszerek alkalmazása, különösen a donorok közötti biológiai variabilitás miatt. Bár a hASC-ket gyakran használják, azok tulajdonságait jelentősen befolyásolják olyan egyéni tényezők, mint az életmód, az anyagcsereállapot vagy a genetikai háttér, amelyek nagymértékben befolyásolhatják az eredményeket.

Humán szubkután fehér zsírszövetből származó, nyilvánosan elérhető egyedi sejtes RNS-szekvenálási adatok elemzése során megfigyelték, hogy a ThT-k expressziója kizárólag az adipocitákra korlátozódik, amely alátámasztja ezek létfontosságú szerepét a zsírszövet sejtjeinek működésében. Az SGBS sejtvonal így praktikus alternatívát kínált, amely áthidalta a primer sejtek nehéz hozzáférhetőségéből és a donorok közti eltérésekből fakadó korlátokat. Korábbi vizsgálatok már kimutatták, hogy a ThT-k gátlása csökkenti a hőtermelő képességet mély nyaki zsírszövetből származó humán adipocitákban. Ezzel összhangban jelenlegi eredmények is azt mutatták, hogy a tiaminfelvételt gátló anyagok, mint a fedratinib és az amprolium, csökkentették a hőtermeléshez kapcsolódó gének expresszióját és a sejtlegzés intenzitását az SGBS adipocitákban. A fedratinib elsődlegesen a ThT2 transzportert gátolja, míg a ThT1-re kevésbé hatékony. Az amprolium, a tiamin szerkezeti analógja, kompetitív módon akadályozza annak sejten belüli felvételét, ezzel intracelluláris tiamin-hiányt idézve elő. Habár a fedratinibnek van JAK2-gátló hatása is, amely befolyásolhatná a hőtermelést, ez a hatás elsősorban más sejttypusok, például immunsejtek jelenlétében érvényesül. Mivel a kísérletek *in vitro* környezetben, kizárólag adipocitákon történtek, a JAK2 szerepe ebben a rendszerben valószínűtlen. Ezt támasztja alá, hogy az amprolium alkalmazása is hasonló hatásokat váltott ki, megerősítve az eredmények megbízhatóságát. Ezek az összefüggések korábban mély nyaki primer humán adipociták esetében is megfigyelhetők voltak.

A tiamin aktív formája, a TPP elengedhetetlen kofaktor olyan mitokondriális enzimek számára, mint a PDH és az α -KGDH. A tiaminfelvétel gátlása csökkentheti a PDH aktivitását, aminek következtében kevesebb NADH keletkezik, csökkentve ezzel a sejtek energiaszintjét. További vizsgálatok szerint az elágazó-láncú aminosavak felvétele fokozott a barna zsírszövet mitokondriumaiban, és ezek lebontása a BCKDH enzimkomplex révén történik, amely szintén TPP-függő, így a tiamin-ellátottság jelentősen befolyásolja működését.

A felnőttek testtömegének jelentős részét a fehér zsírszövet alkotja, amelynek mennyisége szoros kapcsolatban áll az elhízás kialakulásával. Elhízott személyek szubkután zsírszövetében alacsonyabb ThT2 expressziót figyeltek meg a sovány egyénekhez képest. Transzkriptomikai vizsgálatok azt is kimutatták, hogy termogén adipocitákban az adrenerg stimuláció fokozta a ThT1 és ThT2 expresszióját. A db-cAMP által kiváltott adrenerg aktiváció hatására SGBS adipocitákban is megnövekedett a ThT1 expressziója, amely arra utal, hogy a ThT-k kulcsszerepet játszanak a megfelelő hőtermelő válasz kialakulásában. Vizsgálataink során azt is kimutattuk, hogy a db-cAMP stimulációval egyidejűleg alkalmazott, tiaminnal történő kezelés fokozta az UCP1 és más termogenikus gének expresszióját az SGBS adipocitákban.

A mechanizmus, amely révén a tiamin serkenti a hőtermelő gének aktiválását, egyelőre nem teljesen ismert. Feltételezhető, hogy hatást gyakorol az *UCP1* gén transzkripciójára, amelyet többek között a gén nem-kódoló régióiban található, cAMP-érzékeny transzkripciós faktorok és a PGC-1 α kofaktor szabályoznak. Az UCP1 expresszióját ezen kívül a cAMP-jelátvitel útján aktivált transzkripciós faktorok, például a CREB és az ATF2 gyors foszforilációja is befolyásolhatja.

Bár a tiamin-hiány a fejlett országokban viszonylag ritka, az alkoholfogyasztás által érintett személyek körében továbbra is gyakori probléma. Emellett a bariátriai sebészeti beavatkozások, különösen a gyomor bypass műtétek után, a betegek jelentős részénél kialakulhat tiamin-hiány. A DM-ben szenvedőknél is gyakran fordul elő tiamin-hiány, amely hozzájárulhat fokozott oxidatív stresszhez, az endotél diszfunkcióhoz és hiperglikémia okozta sejtkárosodáshoz. Egyes tanulmányok szerint a 2-es típusú diabéteszes betegek nagy hányadánál csökkent az eritrociták transzketoláz aktivitása, míg más vizsgálatokban szinte minden betegnél tiamin-hiányt állapítottak meg, különösen azoknál, akiknél mikroalbuminuria is fennállt. Az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség jelentős részénél szintén alacsony tiaminszintet mértek. Fejlett országokban, köztük az Egyesült Államokban is dokumentáltak gyermekek körében tiamin-hiányos eseteket, ahol a háttérben gyakran elhízás, dm vagy a cukros italok túlzott fogyasztása állt. A tiamin-pótlás javította az endotél funkciót, amely potenciálisan csökkentheti a DM-hez kapcsolódó vaszkuláris szövődmények kialakulásának kockázatát. Ezek a megfigyelések arra

utalnak, hogy a tiamin-hiány szerepet játszhat az elhízással és DM-el összefüggő anyagcsere-zavarok kialakulásában, így a tiamin-pótlás fontos eszköze lehet e betegségek megelőzésének és kezelésének. Egy hathetes, napi háromszori tiamin-pótlás jelentősen javította a glükóztoleranciát hiperglikémiás egyéneknél, míg más vizsgálatokban napi 150 mg tiamin csökkentette az éhomi vércukorszintet olyan 2-es típusú cukorbetegekben, akik még nem szedtek gyógyszert. A kezelés emellett kedvezően befolyásolta a vérzsír- és kreatininszinteket is. A tiamin-hiány további kockázati tényezői közé tartozik az immunrendszer zavarai, a pajzsmirigy túlműködés, a szívelégtelenség, valamint a dialízisfüggő veseelégtelenség.

A tiamin – miután aktív formájává, TPP-vé alakul – nélkülözhetetlen a mitokondriális enzimek működéséhez. Bár állatmodellekben már alátámasztották jelentőségét, a humán adipociták differenciálódására gyakorolt hatásáról még kevés információ áll rendelkezésre. Más sejttípusokban, például T-limfociták esetében viszont már igazolták, hogy a tiamin elősegíti a differenciálódást és a TGF- β termelést, ami alátámasztja szerepét az immunrendszer fejlődésében is. Egy klinikai vizsgálat során, amely elhízott vagy túlsúlyos személyeket vizsgált, egy fehérjében gazdag étrend és napi 2,8 mg tiamin 16 hét alatt jelentős testsúlycsökkenést eredményezett, miközben az eritrociták tiaminszintje nem változott. Az eredmények alapján elmondható, hogy az extracelluláris tiamin-ellátottság optimalizálása elősegítheti a hőtermelő adipociták differenciálódását, amely különösen fontos lehet jövőbeli transzplantációs alapú eljárásokban. A rendszeres tiamin-pótlás biztonságos és költséghatékony módszer lehet az elhízás és az ehhez kapcsolódó anyagcsere-betegségek megelőzésében és kezelésében. Összességében ezek az eredmények felvetik a tiamin étrendi kiegészítőként való alkalmazásának lehetőségét a hőtermelés fokozásában és az elhízás elleni küzdelemben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A barna zsírszövet kiemelt jelentőségű a nem-didergéses hőtermelés szempontjából, amelyet az UCP1 fehérje közvetít. Ez a fehérje a mitokondrium belső membránjában elhelyezkedve biztosítja az energia hő formájában történő leadását az oxidatív foszforiláció és az ATP-szintézis szétkapcsolása révén. Emberben, különösen a nyaki régióban, a barna zsírszövet mind klasszikus barna, mind indukálható bézs adipocitákat tartalmaz, amelyek metabolikus aktivitásuk révén terápiás célpontként szolgálnak az elhízás és a kapcsolódó anyagcsere-betegségek kezelésében. A barna és bézs adipociták aktiválását és hőtermelő kapacitásának fokozását célzó kutatások és vizsgálatok ezért egyre nagyobb figyelmet kapnak.

Jelen vizsgálatunkban az extracelluláris tiamin hatását vizsgáltuk a humán adipociták differenciálódására és termogenikus aktivitására. Ehhez *ex vivo* körülmények között izoláltunk primer humán adipogén progenitor sejteket szubkután és mély nyaki zsírszöveti depókból, majd 14 napon át differenciáltuk őket fokozatosan emelkedő tiamin koncentrációk jelenlétében, lehetővé téve a dózis-függő hatások vizsgálatát. Eredményeink alapján a differenciálódás során alkalmazott nagymennyiségű tiamin szignifikáns mértékben növelte a ThT1 és ThT2 tiamin transzporterek expresszióját mind mRNS-, mind fehérjeszinten, különösen a mély nyaki eredetű adipocitákban. A funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy a tiamin jelenléte fokozta a mitokondriális légzés több paraméterét, így a bazális oxigénfogyasztást, a db-cAMP által indukált respirációt és a protoncsorgásos légzést is, ami a sejtek termogenikus potenciáljának növekedésére utal. Emellett a tiamin pozitívan befolyásolta a mitokondriális biogenezist, valamint koncentráció-függő módon fokozta olyan kulcsfontosságú termogenikus gének expresszióját, mint az *UCP1*, a *PGC1 α* és a *CKMT2*, mind a szubkután, mind a mély nyaki adipociták esetében.

Vizsgálataink során az úgynevezett SGBS sejtvonalat is alkalmaztuk, amely jól jellemzett, nem immortalizált humán adipocita modellként szolgál, és alkalmas a „barnulás” folyamatának és a mitokondriális funkciók tanulmányozására. Ebben a modellben arra kerestünk választ, hogy miként befolyásolja a tiamin elérhetősége — legyen szó többlet tiaminnal való kezelésről vagy a transzporterek gátlásáról — a termogenikus aktivációt adrenerg stimuláció mellett. A ThT1 és ThT2 gátlása szignifikánsan csökkentette a db-cAMP által indukált UCP1 és *PGC1 α* expressziót, valamint csökkentette a protoncsorgásos légzést, amely az UCP1-függő hőtermelés egyik markere. Ezzel szemben a fokozott tiaminbevitel jelentősen fokozta a termogenikus markerek expresszióját, és tovább növelte a db-cAMP által kiváltott tiamin transzporter erexpressziót, amely egy pozitív visszacsatolási mechanizmus jelenlétére utal. Emellett a tiamin

jelenlétében még stimuláció hiányában is fokozódott mind a kapcsolt, mind a szétkapcsolt respiráció, jelezve a tiamin szerepét az alap mitokondriális funkciók fenntartásában is. Megfigyeltük továbbá, hogy a tiamin pótlása növelte a mitokondriális légzési lánc komplexeinek expresszióját is, amely a mitokondriális biogenezis és a respirációs hatékonyság javulására utal.

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a tiamin nem csupán klasszikus koenzimként vesz részt a sejtfunkciók fenntartásában, hanem aktívan szabályozza a humán adipociták termogenikus programját. A tiamin elérhetősége modulálja az adrenerg ingerekre adott transzkripciós és funkcionális válaszokat, amely új lehetőségeket nyithat meg a táplálkozási és farmakológiai intervenciók előtt a hőtermelés és energiafelhasználás fokozása érdekében. Figyelembe véve, hogy a tiamin-hiány különösen gyakori az elhízásban és 2-es típusú DM-ben szenvedő populációk körében, eredményeink alátámasztják, hogy a tiamin hosszú távú pótlása egyszerű és hozzáférhető stratégia lehet a zsírszövet „barnulásának” elősegítésére, valamint a metabolikus rendellenességek mérséklésére.

7. ÚJ EREDMÉNYEK

- A többlet tiamin jelenléte az adipogenezis során fokozza a tiamin transzporterek expresszióját.
- Az adipogenezis során alkalmazott, fokozatosan növekvő tiamin-koncentrációk növelik a tiamin transzporterek expresszióját.
- A tiamin koncentráció-függő módon befolyásolja az adipociták hőtermelő képességét a differenciáció során.
- A mitokondriális biogenezist szignifikánsan befolyásolja a tiamin elérhetősége a nyaki eredetű adipociták differenciációja során.
- A termogenikus gének expressziója a tiamin koncentrációjának emelésével fokozódik az adipociták differenciációja során.
- Az adipocita differenciáció során alkalmazott nagymennyiségű tiamin fokozza mind a kapcsolt, mind a nem kapcsolt respirációt.
- A magas tiaminszintek az adipocita differenciáció során növelik a termogenikus gének expresszióját.
- A nyaki régióból származó adipociták differenciációja során adagolt többlet tiamin fokozza a barna/bézs markerek és termogén gének expresszióját.
- A humán fehér zsírszövet adipocitái mutatják a legmagasabb szintű tiamin transzporter-expressziót.
- A tiamin transzporterek expressziója fokozódik az SGBS adipociták differenciálódását követő adrenerg stimuláció és többlet tiaminnal történő kezelés hatására.
- A tiamintranszporterek db-cAMP által kiváltott aktivációja csökken transzporter inhibitorok jelenlétében.
- A tiamin transzporterek gátlása csökkenti a differenciált SGBS adipocitákban mind a kapcsolt, mind a szétkapcsolt légzést.
- A tiamin transzporterek gátlása az adipogenezist követően csökkenti az SGBS adipociták mitokondriális biogenezisét.
- A tiamin transzporterek gátlása csökkenti a termogenikus markerek expresszióját a differenciált SGBS adipocitákban.
- Az adipogenezist követően alkalmazott többlet tiamin fokozza a kapcsolt és szétkapcsolt légzést.

- A nagymennyiségű tiamin az adipocita differenciáció során fokozza az SGBS adipociták mitokondriális biogenezisét.
- A fehér adipociták differenciálódását követően az emelkedett tiaminszint növeli a termogenikus markerek expresszióját.
- Többlet tiamin jelenlétében a barna/bézs markerek és a termogenezissel kapcsolatos gének expressziója is fokozódik a differenciált SGBS adipocitákban.



Nyilvántartási szám: DEENK/155/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vinnai Boglárka Ágnes
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vinnai, B. Á.**, Arianti, R., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Fésüs, L., Kristóf, E.: The importance of thiamine availability in the thermogenic competency of human adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 599, 1-14, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2025.112483>
IF: 3.8 (2023)
2. **Vinnai, B. Á.**, Arianti, R., Györy, F., Bacsó, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Extracellular thiamine concentration influences thermogenic competency of differentiating neck area-derived human adipocytes. *Front. Nutr.* 10, 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2023.1207394>
IF: 4

További közlemények

3. Arianti, R., **Vinnai, B. Á.**, Alrifai, R., Karadsheh, G., Qais, A. K. Y., Póliska, S., Györy, F., Fésüs, L., Kristóf, E.: Upregulation of inhibitor of DNA binding 1 and 3 is important for efficient thermogenic response in human adipocytes. *Sci. Rep.* 14 (1), 1-13, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-79634-2>
IF: 3.8 (2023)
4. Arianti, R., **Vinnai, B. Á.**, Györy, F., Guba, A., Csósz, É., Kristóf, E., Fésüs, L.: Availability of abundant thiamine determines efficiency of thermogenic activation in human neck area-derived adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 119, 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2023.109385>
IF: 4.8





5. Vámos, A., Arianti, R., **Vinnai, B. Á.**, Alrifai, R., Shaw, A., Póliska, S., Guba, A., Csősz, É., Csomós, I., Mocsár, G., Lányi, C., Balajthy, Z., Fésüs, L., Kristóf, E.: Human Abdominal Subcutaneous-Derived Active Beige Adipocytes Carrying FTO rs1421085 Obesity-Risk Alleles Exert Lower Thermogenic Capacity.
Front. Cell. Dev. Biol. 11, 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2023.1155673>
IF: 4.6
6. Nurcholis, W., Alfadzrin, R., Izzati, N., Arianti, R., **Vinnai, B. Á.**, Sabri, F., Kristóf, E., Artika, I. M.: Effects of Methods and Durations of Extraction on Total Flavonoid and Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Java Cardamom (*Amomum compactum* Soland Ex Maton) Fruit.
Plants-Basel 11 (17), 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants11172221>
IF: 4.5
7. Arianti, R., **Vinnai, B. Á.**, Bartáné Tóth, B., Shaw, A., Csősz, É., Vámos, A., Győry, F., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Kristóf, E., Fésüs, L.: ASC-1 transporter-dependent amino acid uptake is required for the efficient thermogenic response of human adipocytes to adrenergic stimulation.
FEBS Lett. 595 (16), 2085-2098, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.14155>
IF: 3.864

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,364

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,8

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

Debrecen, 2025.04.23.

