

**Gyulladásos folyamatok szabályozása zsírsejtek és
makrofágok közötti interakció valamint
antipszichotikus kezelés révén**

SÁRVÁRI ANITTA KINGA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. FÉSÜS LÁSZLÓ, AKADÉMIKUS



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT-ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

Gyulladásos folyamatok szabályozása zsírsejtek és makrofágok közötti interakció valamint antipszichotikus kezelés révén

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

Írta: Sárvári Anitta Kinga okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt és Immunbiológia doktori iskolája
(programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok:	Dr. Nagy Péter, az MTA doktora
	Dr. Lőw Péter, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológia Intézet
diskussziós terme, 2015. február 27. 11 óra

Az értekezés bírálói:	Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
	Dr. Stienstra Rinke, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora
	Dr. Nagy Péter, az MTA doktora
	Dr. Lőw Péter, PhD
	Dr. Stienstra Rinke, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület
tanterme, 2015. február 27. 13 óra

BEVEZETÉS

1.1 Zsírszövet

Morfológiai és funkcionális szempontok alapján, az emlősök zsírszövetét két csoportra oszthatjuk. A fehér zsírszövet egy lazább szerkezetű szövettípus, mely a bőr alatti (szubkután) régióban és a belső szervek körül (viszcerális) lokalizálódik. A fehér zsírszövet triglicerideket és koleszterolt tárolnak egy nagyméretű zsírcsepp formájában (unilokuláris), míg a barnazsírszövetek, több kisebb méretű lipidcseppet tartalmaznak (multilokuláris), valamint nagy mennyiségű szétkapcsoló fehérjét (UCP-1), mitokondriumot tartalmaznak, mely segítségével zsírsavakat oxidálnak hőtermelés céljából (nem reszkető hőtermelés).

A fehér zsírszövet egy gyorsan változó szövet, gyorsan alkalmazkodik a szervezet energiatátságához. A zsírral telt, érett adipociták teszik ki a zsírszövet legjelentősebb tömegét és térfogatát, annak ellenére, hogy az össz sejtszám csak 20%-a zsírsajt, a többi sejttípus, előzsírszövetek, őssejtek, endoteliális sejtek, makrofágok, fibroblasztok és limfociták. Annak ellenére, hogy a zsírszövetet, mint nyugvó szövetet ismertük meg, ma már tudjuk, hogy adipokineket termelő endokrin szervként funkcionál, mely olyan fontos fiziológiai folyamatokat szabályoz, mint az étvágy, energiafelhasználás, insulin érzékenység, gyulladásos folyamatok és véralvadás. A fehér zsírszövet csupán 10%-a újul meg évente. Az előregedő sejtek, többnyire apoptotizálnak, ezeket pedig professzionális fagociták, mint például a makrofágok takarítják el, ezáltal egyensúlyt tartva fenn a sejtszámot illetően. Mind a normál, mind pedig a kövér zsírszövetben a makrofágok az elhaló zsírszövetek köré csoportosulnak, egy úgynevezett korona szerkezetet hozva létre. Míg a normál zsírszövetben a makrofágok aránya 5%, addig az elhízottak esetében ez a szám 50%-ra nő. Az elhízott zsírszövetben, a makrofágok jellemzően gyulladásos fenotípust mutatnak, a normál zsírszövethez képest. Érdekes módon, a makrofágok száma fogyás közben is megnő a zsírszövetben, bár a zsírszövet ilyenkor nem halnak el, csak a lipid tartalmuk csökken.

1.1.1 A zsírszövet, mint egy anyagszere szerv

Hosszú ideje a zsírszövetet, mint energiatároló szövetet ismertük, mely a lenyelt, majd a keringésben megjelenő trigliceridekből származik. Lipogenezis során, a máj és a zsírszövet is képes zsírsavakat előállítani (de novo zsírsav bioszintézis nem lipid szubsztrátokból, főleg szénhidrátokból). Étekezések között, egy negatív energia egyensúly során, a zsírszövet zsírsavakat bocsátanak ki,

melyek a keringésbe kerülve energiához juttatják a perifériás szöveteket. A zsírszövetben lévő triacil-glicerol lipolízis során mobilizálódik, mely folyamat során a triacil glycerol zsírsavakká és glicerollá hidrolizálódik. A human és rácsálók fehérzsírszövetében zajló lipolízist, az adipocita triglicerid lipáz (ATGL), hormonszenzitív lipáz (HSL) és a monoglicerol lipáz (MAGL) szabályozza. A zsírszövet lipid metabolizmusát (triacil-glicerol raktározás és zsírsav felszabadulás) hormonok (insulin, katekolaminok), valamint egyéb tényezők, mint a evés-éhezés állapota és a sport szabályozzák. A zsírsejtek metabolizmusát szabályozó folyamatok sértetlenségének megőztése elengedhetetlen a test súlyjának karbantartásához.

1.1.2 A zsírszövet, mint endokrin szerv

A nézet, miszerint a zsírszövet csak és kizárólag egy raktározó szövet, 1994-ben, a leptin felfedezésekor, véglegesen megváltozott. A leptin egy kizárólag fehér zsírsejtek által termelt hormone, mely a testsúly fontos szabályozója. Csökkenti a táplálékbevitelt és fokozza az energiafelhasználást hipotalamikus útvonalakon keresztül. A fehér zsírszövet több mint 100féle anyagot képes szekretálni, mely számos élettani kölcsönhatást szabályoz. A metabolitok (zsírsavak), lipid szubsztrátok (prostaglandinok, szteroidok), növekedési faktorok és adipokinek (adiponektin és rezisztin) mellett, a zsírszövet gyulladásos citokineket, kemokineket és hormonokat is termelnek.

A fehér zsírszövet számos útvonalat szabályoz, mint az energia háztartás, glukóz és lipid metabolizmus, pajzsmirigy és szaporító rendszer, immunválaszok, valamint a vérnyomás és a csonttömeg. Ma már elfogadott tény, hogy a fehér zsírszövet egy fontos, aktív endokrin szerv, ezért elképzelhető, hogy maga a rosszul szabályozott fehér zsírszövet játszik szerepet az elhízás során fellépő betegségek létrejöttében.

1.2. Apoptózis

Az apoptózis, egy biokémiai folyamatok által jól szabályozott, programozott sejthalál. Az apoptózis útvonalak belső és külső szignálok által is szabályozhatóak. A külső útvonalakat a sejtfelszínen található receptorokhoz bekötődő ligandok indukálják, míg a hozzá kapcsolódó fehérjék a belső útvonal részét képezik. A belső útvonalakat a sejten belüli stressz megjelenése indukálhatja. Az apoptózis útvonalak aktiválása, a kaszpázok aktiválását eredményezi, melyek általános elhalást indukáló molekulaként funkcionálnak. A cisztein-aszpartát sav proteáz családhoz tartozó kaszpázok, inaktív, proenzim formájában szintetizálódnak, és hasítás útján válnak aktívvá. Amikor a halál ligandok, mint a tumor nekrozis factor alfa (TNF- α), CD95L (APO-1/Fas), vagy a TNF-hez kapcsolódó apoptózist indukáló ligand (TRAIL) bekötődnek a megfelelő receptorhoz, odataborozzák az adaptor molekulákat, mint a Fas-asszociált halál domént (FADD) és az iniciáló kaszpáz-8-at. Ezen molekulák együtt az elhalást indukáló szignál komplexet (DISC) alkotják. A celluláris –szerű FILCE inhibitor fehérje (cFLIP) egy negatív modulátora a halál receptor által indukált apoptózisnak, mely blokkolja a jelátvitelt az aktivált halál receptorokról az útvonal kezdeti szakaszán, ezáltal megakadályozva a kaszpáz-8 toborzását és aktiválását a DISC komplexen belül. Amikor apoptózist indukálunk a zsírszövetekben, a TNF- α -at, egy protein szintézis inhibitorral, a cikloheximiddel együtt (CHX) alkalmazzuk, mely meggátolja a cFLIP szintézisét. cFLIP hiányában a kaszpáz-8 hasítás által aktiválódik a DISC-ben. Az aktiválódott kaszpáz-8 közvetlenül képes apoptózis szignálokat közvetíteni, aktiválva az effector kaszpáz-3-at, vagy alternatív megoldásként, kapcsolódhat a mitokondriális útvonalhoz, hasítva a BH3-interakciós domén halál agonistát (Bid). A Bid, egy Bcl-2 családhoz tartozó fehérje, mely hasítás által, tBid-ként, transzlokálódik a mitokondriumba, ahol a mitokondrium külső membrán áteresztő képességét fokozza. Ezen folyamat, az apoptózis asszociált faktorok, mint a citokróm C, a mitokondrium belső membránközti teréből, a citoszolba való kiszabadulását eredményezik. A kaszpáz-3 aktiválását, a citokróm C felszabadulása váltja ki, a citokróm C/ apoptotikus proteáz aktiváló factor-1/ kaszpáz-9, apoptoszóma complex létrejöttével. Mindkét útvonal a kaszpáz-3 molekulával zárul, mely a sejtek makromolekuláinak, többek között DNS, darabolódást eredményez, mely végül a sejtek elhalásához vezet.

1.2.1. Zsírszövet apoptózisa

Az adipociták apoptózisát, mely a zsírszövet tömegének csökkenését eredményezi, már számos betegség kapcsán, mint a tumor cachexia és az autoimmun lipodisztrófia, kimutatták. Emellett, a

HIV betegek, fokozott anti-retrovirális terápiája során is kimutatták a zsírsajt apoptózisát. Kimutattuk, hogy a zsírsajtek, annak ellenére, hogy az apoptózis útvonal összes komponensét expresszálják, normál fiziológiás körülmények között rezisztensek az apoptózisra. Továbbá, gátolva a protein szintézist, mely az éhezés állapotát kelti, fokozza a zsírsajtek halál ligandok által indukált apoptózisát.

1.3. Elhízás

A túlsúly és elhízás, az energia, zsír formájában történő abnormális, ill fokozott mértékű tárolását jelenti, mely káros hatással van az egészségre. Az elhízás mérőszáma a test tömeg index (BMI), mely az egyén testtömege (kilógrammban megadva), osztva a magassággal (méterben megadva). Egy személy, melynek a testtömeg indexe meghaladja a 30-at, elhízottnak számít (WHO 2014). Az elhízás számos krónikus betegség kialakulásáért felelős, int például a cukorbetegség, szív-és érrendszeri betegségek és rák. Fiziológiás szempontból nézve, a BMI-t a zsírsajtek növekedése és eltávolítása közötti egyensúly szabályozza. A zsírszövet mérete hiperpláziásan, és/vagy hipertrófiásan növekedhet, míg a zsírsajtek eltávolítása apoptózis által történik.

A WHO globális becslései, 2008, kimutatták, hogy a1.4 milliárd felnőtt túlsúlyos, ezen belül 200 millió férfi és közel 300 millió nő elhízott. Összességében, a föld felnőtt populációjának, több mint 10%-a elhízott, mely szám minden évben növekszik. Az elhízás csökkenti a várható élettartamot, évente legalább 2.8 millió ember hal meg a túlsúly, ill. az elhízás következtében. Ugyan, az elhízás megelőzhető lenne, világviszonylatban vezető szerepe van az elhalálozások okainak listáját, a századunk legsúlyosabb közegészségügyi problémájaként említik. Az elhízás kialakulásának okai között, az orvosi, ill. pszichiátriai tényezők mellett, egy feltételezett genetikai hajlamot is meg kell említenünk. Iker kísérletek alapján, egy 40-75%-os örökölhető elhízásra való hajlamot mutattak ki. Mindemellett, genomre kiterjedő vizsgálatok, több olyan egy nukleotidban polimorfikus (SNPs) genre mutattak rá, melyek az elhízással hozhatók kapcsolatba. Habár ezek az eredmények, csak néhány genre igazak, mint például a zsírtömeg és elhízással kapcsolatosakra (FTO). Az elhízás alapvető oka a megnövekedett energiabevitel és a csökkent energiafelhasználás. A mai modern életstílus, mely magas energiájú ételek fogyasztását és mozgáshiányt jelent, tökéletes alapot biztosít az elhízás kialakulásához. Ezen tényezők első körben a zsírszöveten fejtik ki hatásukat.

1.4. Az elhízás következtében kialakult krónikus alacsony fokú gyulladás

Az elhízás következtében egy alacsony fokú gyulladás lép fel a zsírszövetben, mely kapcsolatba hozható számos anyagcsere betegség kialakulásával, mint például a kettes típusú cukorbetegség, atheroszklerózis, és zsírmáj. A gyulladás kialakulásáért főleg a zsírsejtek tehetők felelőssé, melyek gyulladásos adipokineket és citokineket termelnek (IL-6, TNF- α , and MCP-1), ezek pedig a zsírszövetbe vonzák és aktiválják a makrofágokat. Az adipocita hipertrófia és hypoxia hozzájárul a makrofágok zsírszövetbe vándorlásához, ugyanis még több gyulladásos citokin és kemokin termelését indukálják.

1.5. Az atipikus antipszichotikumok elhízásban játszott szerepe

Az atipikus antipszichotikumok, vagy második generációs antipszichotikumok, széles körben használtak a különféle pszichotikus betegségek kezelésében, annak ellenére, hogy e gyógyszerek számos mellékhatást váltanak ki. A legfőbb mellékhatása e gyógyszereknek az elhízás, és az ezzel kapcsolatba hozható metabolikus betegségek, mint a kettestípusú diabetes és diszlipidémia. Az elhízás során megnövekedett zsírszövet tömege, nem csak a zsírsejtek méretének növekedéséből fakadhat, hanem az őssejtekből differenciálódó zsírsejtek számának növekedéséből is. Rágcsálókban származó zsírsejteken végzett kísérletek arra utalnak, hogy az atipikus antipszichotikus kezelések növelhetik a lipid akkumulációt és az adipogenezist egyaránt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az adipogenezis az a folyamat, amely során az mezenhimális őssejtek zsírsejttekké alakulnak, egy még kevésbé kutatott jelenség. Célul tűztük ki, hogy 1) kvantifikáljuk a zsírsejtek érési folyamatát és hogy 2) statisztikai méréseket végezzünk, nyomon követve a zsírsejt fejlődés során kialakuló morfológiai és viabilitási változásokat.

Habár közvetlen kontakt alakul ki a makrofágok és zsírsejtek között, az elhízás során kialakuló ún. “korona szerkezet” következtében, nem sokat tudunk ezen interakció következményeiről. Az irodalomban fellelhető eredmények, “*in vivo*” egér kísérletekből származnak, csak néhány sejtenyészeten alapuló kutatást találunk. Ezen kutatások rávilágítottak a zsírsejtek és makrofágok között létrejövő kontakt fontosságára, mely olyan gyulladásos citokinek termeléséhez vezet, mint az IL-1 β , TNF- α és IL-6. Tudjuk, hogy a human makrofágok aktivációs profilja különbözik az egerekétől, ezért létrehoztunk egy humán *in vitro* kísérleti rendszert, amelyben a zsírsejtek és makrofágok interakcióját és ennek következményét vizsgálhatjuk. Feltételezésünk az volt, hogy ezen interakció során, a zsírsejtek makrofágok általi fagocitózisa befolyásolja a zsírszövetben termelődő gyulladást csökkentő és kiváltó citokinek termelésének szabályozását. 3) Alá szeretnénk volna támasztani ezen hipotézisünket, valamint 4) vizsgálni kívántuk ezen interakció gyulladásos következményeinek kialakulásának körülményeit.

Keveset tudunk az AAPk humán preadipocitákra és adipocitákra kifejtett hatásáról, ezért 5) további célunk volt még az atipikus antipszichotikumok differenciálódó zsírsejtekre kifejtett hatásának vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1.1. Zsírszövetből származó őssejtek izolálása

Az általunk alkalmazott zsírszövet, sérvműtéten átesett páciensek bőr alatti (szubkután) régiójából származott. Az önkéntes donorok szelekcióját a testtömeg indexük alapján alapján végeztük (< 30), kor és nemre való tekintet nélkül. A műtétet megelőzően, a páciensek aláírtak egy betegfájókoztatót és beleegyező nyilatkozatot. A kutatási tervet a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte (No. 3186-2010/DEOEK RKEB/IKEB). A zsírszövet mintákat (1-10 ml), a műtétet követően azonnal a laboratóriumunkba szállítottuk, majd a szövet feldarabolása után őssejteket izoláltunk kollagenázos emésztést alkalmazva (120 U/ml) 60 percig, 37°C-os vízfürdőben. A teljesen szétesett szövetet, átszűrjük egy 140 μm átmérőjű szűrőn, majd 1300 rpm-en 10 percig centrifugáltuk a sejtszuspenziót. A pelletben található őssejteket, 10% magzati borjú szérumot (FBS), 100U/ml penicilin/sztreptamicint és 33/17 μM biotin/pantotént tartalmazó DMEM-F12 tápfolyadékban tenyésztettük, 37°C-on 5% CO_2 -ot tartalmazó inkubátorban. 24 órát követően óvatosan eltávolítottuk a nem letapadt, még úszó sejteket, majd a meglévő sejteket tovább tenyésztettük, míg teljesen be nem nőttek a tenyésztő edényt.

3.1.2. Zsírsejt differenciáció

Zsírszövetből izolált őssejteket, ill. Simpson-Golabi-Behmel szindrómás (SGBS) betegből származó prekursor sejtek használtunk kísérleteinkhez, zsírsejt forrásként. Az SGBS preadipociták, egy a humán zsírsejtek tanulmányozására, nemrégiben kifejlesztett modell. Ezen sejtek képesek zsírsejteké alakulni, és a génexpressziós mintázatuk is nagyban megegyezik az érett zsírsejtekével. A preadipocitákat 8 lyukú ibidi sejtenyésző edénybe helyeztük, 1.5×10^4 sejt/ cm^2 koncentrációban és 10% FBS-t tartalmazó DMEM-F12 tápfolyadékban tenyésztettük őket a konfluencia eléréséig, ekkor szérummentes tápfolyadékra váltva, mely 2 μM roziglitazont, 25 nM dexametazont, 500 μM 3-isobutyl-1-methylxantint, 10 $\mu\text{g/ml}$ humán apo-transzferrint, 20 nM humán inzulint, 100 nM kortizolt, és 200 pM triiodotirozint tartalmaz, beindítottuk a zsírsejt differenciálódást. Az ötödik napot követően lecseréltük a tápfolyadékot 10 $\mu\text{g/ml}$ humán apo-transzferrint, 20 nM humán inzulint, 100 nM kortizolt, és 200 pM triiodotirozint tartalmazó szérum mentes DMEM-F12-re.

3.1.3. Makrofág differenciáció

A humán perifériás vérből származó monocitákat (PBMCs) Ficoll-Paque Plus-os, grádiens centrifugálást alkalmazva izoláltuk, egészséges betegekből származó vérkészítményből (Buffy coat) A CD14⁺ sejteket Vario-MACS-ot alkalmazva, mágneses szeparálással, választottuk el, majd 0.5% BSA-t és 2 mM EDTA-t tartalmazó PBS-ben mostuk a sejteket. A frissen izolált monocitákat 10⁶ sejtsűrűségben, 24 lyukú settenyésző edénybe helyeztük, 10% humán AB szérumot és 5 nM makrofág kolónia-stimuláló faktort (MCSF) tartalmazó IMDM tápfolyadékban tenyésztettük őket, 5 napon át. A harmadik napon le kell cserélni a tápfolyadékot frissre.

3.1.4. Fagocitózis esszé

A primer adipocitákat (PA) és az SGBS adipocitákat (SA) 10 napig differenciáltattuk, majd 31 percen keresztül megfestettük őket Hoechst 33342 (50 µg/ml) és 1 µg/ml Nílus vöröst alkalmazva. A sejteket a festést követően óvatosan kétszer mostuk PBS-sel, ezzel megelőztük a feleslegben maradt festékek által előforduló a makrofágok nem specifikus festőségét. A makrofágokat fluoreszkáló festék segítségével zöldre festettük (CMFDA), majd 5:1-es arányt alkalmazva a zsírs sejtekre rétegeztük és 24 órán át együtt tenyésztettük őket. A fagocitózis rátát a lipid cseppeket tartalmazó makrofágok arányából számoltuk, melyet lézerpásztázó mikroszkóp, ill áramlási citmer alkalmazásával detektáltunk. Az áramlási citométer adatait WinMDI2.8. szoftver segítségével elemeztük.

3.1.5. Apoptózis indukálás

Az SGBS sejtek differenciálódása során, háromnaponta, 12 órás, 10 nM humán TNF- α és 10ng/ml cikloheximid (CHX) kezelést alkalmazva indukáltunk apoptózist.

3.1.6. Lézerpásztázó mikroszkópos mérés (LSC)

A képkalkuló citometriás méréseket iCys Research Imaging Cytometert alkalmazva végeztük, mely egy 405-nm 488-nm, és 633-nm szilárdtest lézerrel van felszerelve. A különböző lézerek, a következőképp működnek, 405-nm ibolya, a Hoechst 33342-t gerjeszti, mely a sejtmagokat jelöli, a 488-nm kék lézer pedig a CMFDA-t, mely a makrofágot festi; a Nílus vörös a zsírcseppeet festi. A festékek emissziós hullámhossza a következő: Hoechst 463 $\pm$ 20 nm, CMFDA 530 $\pm$ 15 nm és Nílus vörös 580 $\pm$ 15 nm. A képeket egy automatikus sejtfelismerő program segítségével elemeztük, iCys,

ImageJ és CellProfile szoftvereket alkalmazva. A fagocitózis rátát a lipid cseppeket tartalmazó makrofágok arányából számoltuk.

3.1.7. Time-lapse mikroszkópos elemzés

A zsírszöveteket Nilus vörössel és Hoechst 33342-vel festettük, majd a makrofágokat rájuk rétegeztük, 5:1-es arányban és 15 órán keresztül tenyésztettük őket együtt fiziológiás körülmények között, egy motorizált IX81 Olympus inverz mikroszkóppal követtük nyomon, mely egy hűtött Hamamatsu ORCA-R2 magas felbontású monokróm CCD camera és egy DP21-CU 2-megapixel digitális színes kamerával volt felszerelve. Minden ötödik percben készült egy kép a sejtekről, mely az xcellence program segítségével videóvá lett alakítva.

3.1.8. Citokin termelés meghatározása

Az érett zsírszövetek (PA, SA) 12 órán át tenyésztettük együtt a makrofágokkal, majd ezt követően begyűjtöttük a tápfolyadékot, hogy megmérjük a kibocsátot citokinek szintjét. Néhány mintában az együttenyésztést megelőzően, a makrofágokat előkezeltük 100 μ M SC-514, IKK-2 inhibitorral, vagy 50 μ g/ml SN50, NF- κ B inhibitorral. Egyéb kísérletekben, pedig 50 ng/ml LPS-sel, ill. 20 μ M CytochalasinD-vel (CytD) kezeltük elő a makrofágokat. ELISA DuoSet alkalmazásával megmértük a termelődött interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-8, TNF α , MCP-1 szintjét.

3.1.9. Az intracelluláris IL-6 citokin immunfestése

A makrofágokat előfestettük CMTMR fluoreszcens festékkel és a zsírszövetekkel való 12 órás együttenyésztést megelőzően kezeltük őket 100 ng/ml BrefeldinA-val (BrefA). 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd 0.1% triton X-100-al permeabilizáltuk a sejteket. Elsődleges antitestként kecske poliklonális anti-humán IL-6 IgG, 1:200 hígításban, majd 1:500 hígítású, nyúlban termelt anti-kecske IgG-FITC jelölt antitestet használtunk másodlagos antitestként. Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóp segítségével készítettük a felvételeket. IL-6 (FITC 488 nm), makrofágok (CMTMR 546 nm) és sejtmag (NucRed 647 nm).

3.1.10. Real-time Q-PCR

A makrofágokat 30 percig előkezeltük 50 ng/ml LPS-sel, majd együtt tenyésztettük a zsírszövetekkel (PA vagy SA). A sejteket 1, 2, 3, 4, 5, 6 és 12 órát követően begyűjtöttük 1 ml Tri Reagent-ben és

total RNS-t izoláltunk belőlök, melyet cDNS-sé írtunk át (High-Capacity Reverse Transcription kit). Az IL-6 átíródásának szintjét valós idejű Q-PCR-t alkalmazva (TaqMan Gene Expression Assay). A kísérletet háromszor ismételtük meg, az mRNS szintet pedig a GAPDH háztartási gén szintjéhez hasonlítottuk.

3.1.11. Gyógyszeres kezelés

Az általunk vizsgált hétféle antipszichotikumot DMSO-ban oldottuk fel és a következő koncentrációban alkalmaztuk: olanzapin 50 ng/ml, ziprasidon 50 ng/ml, clozapin 100 ng/ml, quetiapin 50 ng/ml, aripiprazol 100 ng/ml, haloperidol 10 ng/ml, risperidon 50 ng/ml. A gyógyszeres kezelést a 11 napig tartó differenciáció első napján kezdtük, majd minden nap megismételtük, a tápfolyadékot három naponként frissre cseréltük.

3.1.12. Statistical analysis

A statisztikai analízishez kétvégű, páros t-TESZT-et (*), és két irányú ANOVA tesztet (#) alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

3.2. A zsírszövet *in vitro* körülmények közötti differenciálódásának nyomon követése

A sejt differenciáció nyomon követése és karakterizálása 15 napon keresztül zajlott. A zsírszövetekké való elköteleződést már a differenciálódás 2-3. napján megfigyeltük, amikor is megváltozott a citoplazma fényáteresztő képessége. Ekkor még nincsenek jól kivehető, Nilus vörös által (triglicerid) festett lipid cseppek, viszont a sejtek festődnek Nilus kékkel (foszfolipid). Az ötödik nap körül már néhány kisebb méretű lipidcsepp látható, valamint a sejtmag kondenzáció fokozódik, ellentétben a differenciálatlan preadipocitákkal, melyek nagyobb méretű citoplazmával és sejtmaggal rendelkeznek. A hatodik és tizenkettedik nap között tipikus morfológiai változásokon megy keresztül a differenciálódó zsírszövet, mint pl a sejtek lekerekednek, a citoplazma megtelik Nilus vörös által festődő lipid cseppekkel, a sejtek kevésbé fényáteresztőek, valamint a sejtmag kondenzálódik és csökken a mérete. A 9-12 nap körül a differenciációs ráta eléri a maximum, 40%-ot, ezután telítődik a differenciációs görbe. A tizenkettedik napot követően, nem jelentek meg új lipid cseppek, hanem a megkérőzők fuzionáltak egymással.

3.3. Az apoptózis detektálása és kvantifikálása az előzsírszövetekben és az érett zsírszövetekben

A mintákat lemértük a TNF- α és CHX kezelést megelőzően és után, így információt nyertünk az adott sejtekre kifejtett hatásáról. A kezelést megelőzően Annexin V-tel festődő sejtek a spontán apoptotizáló sejteket, míg a kezelést követően az indukált apoptózist szenvedő sejteket jelölik. 7.05 % és 17.91 % közötti spontán apoptózist detektáltunk mind az előzsírszövetekben, mind pedig a zsírszövetekben. A TNF- α és CHX kezelést követően megnőtt az Annexin V pozitív sejtek száma, a preadipociták 26.06 % - 50.09 %-a halt el, míg a zsírszövetek 30 %-a festődött Annexin V-tel.

Az apoptózis indukció apoptotikus testek megjelenését eredményezte, mely a DNS fragmentálódásával, tipikus membrán buborékok megjelenésével és kondenzálódott sejtmaggal jár. Számottevő sejtesvesztést figyeltünk meg a kísérleteink során, mely arányaiban megegyezett a kezelés által okozott sejthalál kialakulásával, 24.12 % $\pm$ 10.5 % sejtesvesztést tapasztaltunk a kezelt mintában, míg 10.67 % $\pm$ 4.52 % a kontrolban.

3.4. Az apoptotikus zsírsejtek makrofágokra kifejtett hatása

A TNF- α + CHX kezelt zsírsejteket 3, ill. 24 órán át tenyésztettük együtt makrofágokkal, majd ezt követően lézerpasztázó mikroszkóppal, ill. áramlási citométerrel, meghatároztuk a zsírcseppeket tartalmazó makrofágok számát. Mindkét módszer segítségével megállapítottuk, hogy 3 óra elteltével a makrofágok 25-40%-a, míg 24 óra elteltével közel 60 %-a tartalmazott zsírsejtekből származó lipidcseppeket.

Hogy alátámasszuk ezen elhaló sejtek apoptotikus mivoltát, LPS kezelt gyulladásos makrofágokkal tenyésztettük őket együtt, majd megvizsgálva a gyulladásos citokinek szintjén, az IL-6 és IL-1 β szintje csökkent, mely az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő tulajdonságát jelöli.

3.5. A makrofágok darabokat bekebeleznek be az érett zsírsejtekből

A zsírsejtekben fellépő spontán apoptózis mellett, egy spontán DNS fragmentációt is megfigyeltünk a differenciálódás során, mely nem jár együtt sejthalállal. Szerettük volna megvizsgálni, hogy a makrofágok képesek-e bekebelezni a nem elhalt sejteket is. Az együtt tenyésztést követően a makrofágok magas arányban tartalmaztak zsírsejtből származó lipidet. Az előbb említett minkét módszerrel meghatároztuk a lipid cseppeket tartalmazó makrofágok arányát és azt láttuk, hogy 3 óra elteltével, a makrofágok 15%-a míg 24 óra elteltével már 25-30%-a tartalmazott lipidcseppeket. Time-lapse mikroszkópos felvételeket készítettünk, melyen nyomon követhettük a bekebelezés folyamatát, azt láttuk, hogy több makrofág (sokkal kisebb méretűek a zsírsejthez képest) vesz körül egy zsírsejtet és darabokat bekebelez be.

3.6. A zsírsejtek és makrofágok közötti interakció IL-6 szekréciót eredményez.

Az interakció következtében nagymértékben megnőtt az IL-6 citokin szintje. Hogy bebizonyítsuk, hogy az IL-6 szekréció adipocita-makrofág interakció specifikus jelenség és nem csak a makrofágok reakciója arra, hogy nem képesek letapadni a sejtenyészítő edény alá, HEK sejtekre rétegeztük a makrofágokat, mely esetben elmaradt az IL-6 szekréció. A TNF- α , IL-8 és IL-1 β szintje nem emelkedett; míg az MCP1 szintje megemelkedett az interakció következtében.

3.7. Az adipocita-makrofág közötti interakció során termelődő IL-6-ot a fagocitáló makrofágok termelik

Begyűjtöttük az adipocita tápfolyadékot, majd ebben tenyésztettük a makrofágokat, hogy megvizsgáljuk, hogy a zsírsejtek termelnek-e olyan molekulát, ami IL-6 szekréciót indukál a makrofágokban. Mivel a makrofágok nem termeltek IL-6-ot, így azt a következtetést vontuk le, hogy a két sejt közötti interakció szükségeltetik az IL-6 termeléshez. CytD-vel előkezeltük a makrofágokat, ezáltal meggátoltuk a fagocitózist, a sejtek érintkeztek egymással ugyan, de ez sem vezetett IL-6 szekrécióhoz, így bebizonyosodott, hogy a zsírsejtek bekebelezése szükséges a makrofágok citokin termeléséhez.

Ezt követően összehasonlítottuk az LPS kezelt makrofágok által termelt és az interakció során keletkezett IL-6 mRNS és szekretált fehérje szintjének dinamikáját. Hasonló dinamikát mutatott az idő függvényében, ez azt jelenti, hogy az interakció során az IL-6 *de novo* termelődött.

3.8. Az interakció során keletkezett IL-6 az NF- κ B útvonalon keresztül szabályozódik

Hogy biztosan megállapítsuk, melyik sejtek termelik az IL-6 citokint az interakció során, brefeldin A (BrefA) kezelést alkalmazva, megakadályoztuk a citokin sejtekből való kijutását, majd immunfestéssel megfestettük az IL-6-ot. A zsírsejtekben nem, hanem a fagocitáló makrofágokban detektáltunk IL-6-ot, ezzel rávilágítva arra, hogy az interakció során a makrofágok termelik a citokint.

Meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy az interakció során keletkezett IL-6 NF- κ B útvonalon keresztül szabályozódik-e, ezért NF- κ B inhibitorokat alkalmaztunk, mint a SC-514 (IKK β (IKK-2) inhibitor) és SN50 (megakadályozza az NF- κ B aktív komplex sejtmagba jutását). Mindkét inhibitoros kezelés hatására csökkent az IL-6 szintje, ezzel igazolva az NF- κ B útvonal szerepét az interakció során keletkezett citokin szintézisének szabályozásában.

3.9. Az érett zsírsejtek hatása az LPS kezelt gyulladásos makrofágok citokin termelésére

Meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy a zsírsejtek hogyan befolyásolják a makrofágok citokin termelését már egy eleve gyulladásos közegben, ezért az együtt tenyésztést megelőzően előkezeltük a makrofágokat LPS-sel, ezáltal gyulladást indukálva. Begyűjtöttük a tápfolyadékokat és megértük az

IL-6, IL-8, MCP1 és TNF α citokinek szintjét. Az IL-6 szintje nem változott, míg az IL-8 szintje csökkent. A legdrasztikusabb csökkenést az MCP-1 és a TNF- α esetében tapasztaltunk.

3.10. Antipszichotikumok hatása a zsírszövet differenciálódás során alakuló génexpressziós mintázatára

A zsírszövetből izolált őssejtek homogenitását flócitometriás analízissel ellenőriztük, mely kimutatta, hogy a sejtek több, mint 90%-a expresszálta a mezenhimális őssejtmarkereket, mint a CD73, CD90, CD105 and CD147. A gyógyszeres kezelést a differenciáltatás első napján kezdtük, majd 26 gén expressziós szintjének vizsgálata rámutatott arra, hogy a gyógyszerek az adipocita marker gének és gyulladásos citokinek génjeinek expressziójára pozitív hatással vannak.

3.11. Az antipszichotikumok hatása a gyulladásos citokinek transzkripciójára

Az NF- κ B1 szintje, amely egy gyulladásos citokinek expresszióját indukáló transzkripciós faktor, megnőtt a zsírszövetekben az olanzapin, clozapin, quetiapin, aripiprazol, és haloperidol antipszichotikus kezelés hatására. Ezzel párhuzamosan a TNF- α , IL-1 β , IL-8 és MCP-1, szintje is megnövekedett ziprasidon, clozapin, quetiapin és haloperidol kezelést követően.

3.12. Az antipszichotikumok hatása a primer adipociták citokin termelésére

Megmértük a szekretált TNF- α , IL-1 β , IL-8 és MCP-1 szintjét az antipszichotikummal kezelt zsírszövet felülszójában. A TNF- α szintje, csak a ziprazidon hatására növekedett, az IL-8 szintjét a clozapin és aripiprazole kezelés növelte, míg az MCP-1 koncentrációja szignifikánsan nőtt a clozapin, ziprasidon és olanzapin kezelés következtében. Az IL-1 β szintje a mérhető tartomány alá esett.

5. DISZKUSSZIÓ

SPONTÁN ÉS INDUKÁLT APOPTÓZIS A DIFFERENCIÁLÓDÓ ZSÍRSEJTEKBEN

A TNF α és CHX kezelés apoptózist indukált mind az adipocitákban, minde a preadipocitákban, mely utóbbi érzékenyebbnek bizonyult a kezelésre.

Az általunk kifejlesztett lézerpasztázó mikroszkópos módszer segítségével detektáltuk és kvantifikáltuk az Annexin V által festődött apoptotikus sejteket. A preadipociták és az adipociták azonos szintű spontán apoptózist mutattak.

AZ ADIPOCITÁK MAKROFÁGOK ÁLTALI TROGOCITÓZISA ÉS ENNEK KÖVETKEZMÉNYEI

Az adipocita makrofág interakció vizsgálata során, azt tapasztaltuk, hogy a makrofágok nagy mértékben bekebeleznek be sejtkompartmenteket, főleg lipidcseppeket a zsírsejtekből. Ezen megfigyelt jelenség nem a tipikus fagocitózisra utal, amikor a falósejtek az apoptotikus sejtek teljes egészét bekebelezik, megőrizve ez által a szövetek integritását, épségét. A mi esetünkben a makrofágok nem csak az elhaló, de az élő adipocitákból is bekebeleztek be lipidet, de DNS származékot nem detektáltunk. Ezen jelenség a trogocitózis, amikor a falósejtek darabokat harapnak ki a környező élő sejtekből, energiaszerzés céljából. Ahogy már ezt bemutattuk, ezen sejtek néhány foszfátidikl szerint expresszálnak a felszínükön, valamint DNS fragmentálódást is mutatnak, annak ellenére, hogy ezen sejtek továbbra is élő sejtek.

Az adipocita darabok bekebelezése által nagy mennyiségű lipid kerül a makrofágokba, mint például oxidált zsírsavak és oxiszteerolok, ezek ligandként funkcionálnak a PPAR család számára, ezáltal a makrofágok alternatív aktiválása megy végbe és gyulladásos citokineket termelnek. Ezen lipidbekebelezés következtében a makrofágok IL-6-ot szekretáltak, míg a TNF- α és az IL-1 β szintje nem emelkedett. Immunfettett mintáinkból nyilvánvalóvá vált, hogy a lipid tartalommal rendelkező makrofágok termelik az interakció során keletkezett IL-6 citokint, ennek ellenére továbbra sem zárható ki, hogy a zsírsejtek is képesek IL-6 szintézisre.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a szabad zsírsavak és egyéb lipid metabolitok a TLR receptorokon keresztül képesek befolyásolni a makrofágok gyulladásos állapotát. Mivel a mi kísérleti rendszerünkben az adipocita tápfolyadékban tenyésztett makrofágok nem termeltek IL-6-ot,

így kizárhatjuk, hogy esetleg a zsírsejtek által kibocsátott zsírsavval indukálnák ezen citokin termelődését. A makrofágok által bekebelezett, zsírsejtekből kiharapott, lipidcseppek indukálták az IL-6 termelését. Mivel a TLR receptor család a sejtfelszínen helyezkedik el, ezért egy TLR-független IL-6 szekrécióról lehet szó.

A TROGOCITÓZIS KÖVETKEZTÉBEN TERMELŐDÖTT IL-6 CITOKIN LEHETSÉGES GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSA

Ugyan a zsírszövet, expresszálja mind az IL-6-ot, mind pedig a TNF- α -át, de csak a szubkután zsírszöves képes az IL-6 szekrécióra, mely bekerülve a véráramba, szisztematikusan hat a szervezetre. Az IL-6 termelés magasabb az elhízott egyénekben, mely arra enged következtetni, hogy szerepe lehet a testsúly szabályozásában, és a lipid metabolizmusban. Az leptin receptor nagyfokú hasonlóságot mutat az IL-6 szignaling részét képező gp130 receptorral, mely hasonló étvágy szabályozó képességet sugall.

Míg a TNF- α és IL-1 β gyulladásos szerepe megkérdőjelezhetetlen, addig az IL-6 citokinnek kettős szerepet tulajdonítanak, miszerint gyulladás csökkentő és gyulladást keltő is lehet. A klasszikus NF- κ B medial gyulladásos szignalizáció mindhárom citokin, a TNF- α , IL-1 β és IL-6, szintje megnő, viszont a mi esetünkben egy izolált IL-6 szekréciót detektáltunk. Előző kutatások kimutatták, hogy az IL-6 képes csökkenteni a TNF- α és IL-1 β szintjét, mind mRNS, mind pedig fehérje szinten, ugyanakkor ezen citokinek antagonistáinak termelését is indukálhatja. Mivel az elhízott zsírszövetben gyulladás lép fel, megvizsgáltuk a zsírsejtek hatását az LPS kezelt gyulladásos makrofágok citokin termelésére. Az IL-6 szintje nem változott, míg az MCP1 és TNF- α szintje szignifikánsan csökkent. Ezen adatok alapján, a mi rendszerünkben megjelenő IL-6 citokinnek gyulladáscsökkentő szerepet tulajdonítunk.

AZ ATIPIKUS ANTIPSZIHOTIKUMOK ÁLTAL INDUKÁLT GYULLADÁSOS REAKCIÓK A ZSÍRSEJTEKBEN

Ugyan az atipikus antipszihotikumok széles körben alkalmazott gyógyszerek, keveset tudunk ezek génexpresszióra kifejtett hatásáról és az esetleges donorspecifitásukról. Az sem tisztázott még, hogy pontosan milyen mellékhatásokat okoz, illetve ezek hogyan alakulnak ki. Ezen kérdések megválaszolása céljából egy 26 génből álló génexpressziós panelt állítottunk össze. A

legemlékeztetőbb eredményünk az volt, hogy ezen gyógyszerek fontos adipocita specifikus gének expresszióját indukálják. A 26 vizsgált gén közül, a clozapin 21 gén, az aripiprazol 20, a quetiapin 18, az olanzapin 13, a ziprasidon 7 és a risperidone 6 gén expresszióját indukálta. Adataink gyógyszerek hatásának nagyfokú donorspecifitásra világítottak rá.

Fontosnak találtuk egy in vitro kísérletes rendszer létrehozását, mely segítségével megfigyeltük és karakterizáltuk a zsírszövet és makrofágok közötti interakciót. Ezen rendszer alkalmazásával több információt szerezhetünk az elhízáskor fellépő gyulladásos folyamatról, valamint fontos lehet gyógyszerek hatásának vizsgálatában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során, nyomon követtük a zsírs sejtek érési folyamatát, sejtenkénti méréseket végeztünk és egyazon idő alatt tudtuk vizsgálni mind az érett és éretlen zsírs sejteket. Spontán apoptózis jelenlétét észleltük, mind a zsírs sejtek, mind pedig az előzsírs sejtek esetében, az érési folyamat alatt, valamint az előzsírs sejtek nagyobb érzékenységet mutattak a $TNF\alpha$ és a CHX kombinált kezelés hatására.

Egy új *in vitro* kísérleti rendszert alkalmazva, nyomon tudtuk követni, a zsírs sejtek és makrofágok hatását. Együtttenyésztésük során az élő sejtek makrofágok általi trogocitózist észleltük time-lapse mikroszkópos felvételek segítségével, mely jelenséget lézerpáztázó mikroszkópiával, valamint áramlási citométerrel kvantifikáltunk. A makrofágok nagy mennyiségű, *de novo* termelődött IL-6 szekrécióját detektáltuk, mely a zsírs sejtek lipid tartalmának bekebelezése révén keletkezett.

A tipikus gyulladásos citokinek, mint a $TNF\alpha$ és az IL-1 β hiánya és a több funkcióú IL-6 szeparált megjelenése új szerepben tünteti fel az IL-6 citokint ebben az interakcióban. Eredményeink az IL-6 gyulladásos csökkentő szerepét támasztják alá, gátolva a $TNF\alpha$ és MCP-1 szintjének növekedését, fenntartva a zsírszövet nyugalmi állapotát, valamint megakadályozva a gyulladásos citokinek szintjének növekedése következtében fellépő inzulin rezisztencia és egyéb metabolikus betegségek megjelenését.

A gyulladásos gének szintjének összehangolt növekedését figyeltük meg egy csoport antipszichotikus gyógyszer alkalmazásának hatására. Három, a vizsgált gyógyszerek közül, mégpedig a clozapine, quetiapine és aripiprazole, egyértelmű hajlamosságot mutattak a zsírsajt specifikus markergének szintjének indukálására. Ezen adatok azt jelzik, hogy a betegség következtében, elsődlegesen fellépő gyulladástól függetlenül, kialakulhat egy másodlagos, zsírsajt függő, gyulladásos elváltozás, mely hozzájárulhat a monocita-makrofág felhalmozódás, az MCP-1 expresszió növelésével, ezáltal a bevándorló makrofágok válnak a gyulladásos citokinek harmadik forrásává, mely tovább fokozza a második generációs antipszichotikumok által okozott metabolikus szindrómák kialakulásának lehetőségét



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/411/2014.
Tételszám:
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sárvári Anitta Kinga
Neptun kód: FDDN8F
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola
Mtmt azonosító: 10040217

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. **Sárvári, A.K.**, Doan-Xuan, Q., Bacsó, Z., Csomós, I., Balajthy, Z., Fésüs, L.: Interaction of differentiated human adipocytes with macrophages leads to trogocytosis and selective IL-6 secretion.
Cell Death Dis. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.579>
IF: 5.177 (2013)
2. **Sárvári, A.K.**, Veréb, Z., Uray, I.P., Fésüs, L., Balajthy, Z.: Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 450 (4), 1383-1389, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.005>
IF: 2.281 (2013)
- * 3. Doan-Xuan, Q.M., **Sárvári, A.K.**, Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Balajthy, Z., Fésüs, L., Bacsó, Z.: High content analysis of differentiation and cell death in human adipocytes.
Cytom. Part A. 83 (10), 933-943, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22333>
IF: 3.066



* Doan-Xuan, Q.M. és Sárvári, A.K. megosztott első szerzők.



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



További Közlemények

4. Bánfalvi, G., **Sárvári, A.**, Nagy, G.: Chromatin changes induced by Pb and Cd in human cells.
Toxicol. Vitro. 26 (6), 1064-1071, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.016>
IF:2.65

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,174

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,524

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

Debrecen, 2015.01.09.



KONFERENCIÁK/POSZTEREK

1. **VI. Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, Hungary**
Characterization of inflammatory reactions of human macrophages to differentiating adipocytes (oral presentation in English)
2. **2nd International Conference on ImmunoMetabolism: Molecular and Cellular Immunology of Metabolism, Rhodes, Greece** Characterization of inflammatory reactions of human macrophages to differentiating adipocytes (oral presentation in English)
3. **Conference of Hungarian Molecular Life Sciences, Siofok, Hungary**
Characterization of inflammatory reactions during human adipocyte & macrophage co-incubation (oral presentation in English)
4. **ECDO 20th Euroconference on Apoptosis “From Death to Eternity”, Rome, Italy**
Adipocyte cell death and clearance (poster presentation)
5. **FEBS advanced course: From lipidomics to disease and green energy, Spices, Greece, Adipocyte cell death and clearance** (poster presentation)
6. **FEBS 3+ meeting, Opatija, Croatia**
Adipocyte cell death and clearance (oral presentation in English)
7. **V. Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, Hungary,**
Adipocyte cell death and clearance (oral presentation in English)
8. **Annual Meeting of Hungarian Biochemical Society, Pécs, Hungary**
Studying human adipocyte cell death in vitro (poster presentation)
9. **Apoptotic Cell Recognition & Clearance; Death and Damage in Development and Disease; Gordon Research Conference, Bates College, Lewiston, ME, USA**
10. **Apoptotic Cell Recognition & Clearance; Gordon-Kenan Research Seminar** Bates College, Lewiston, ME, USA *Studying human adipocyte cell death in vitro* (poster presentation)
11. **IV. Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, Hungary**
Studying in vitro human adipocyte apoptosis (oral presentation in English)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban a témevezetőmnnek, Fésüs László professzor úrnak szeretném kifejezni hálámat a támogatásáért és, hogy biztosította a körülményeket a kutatások elvégzéséhez, valamint Dr. Balajthy Zoltánnak, a doktori időszakom alatt nyújtott hasznos tanácsokért.

Hálás köszönet Szondy Zsuzsanna professzornőnek, Nagy László professzor úrnak és Töszér József professzor úrnak és munkacsoportjaiknak, a segítséget és, hogy használhattam műszereiket.

Köszönetet szeretnék mondani Nagy Jennifernek, Klem Atilláné Erzsikének és Szalóki Szilviának a kitűnő aszisztenciáért és segítségért.

Hálás vagyok kollaborációs partnereiknek, Dr. Bacsó Zsoltnak és Dr. Quang-Minh Doan-Xuan-nak a lézerpáztázó mikroszkópos kísérletekben nyújtott segítségért, Csomós Istvánnak, a konfokális mikroszkópiában nyújtott segítségért, és Újházi Boglárkának a time-lapse mikroszkópos kísérletekben nyújtott segítségért. Köszönöm Rajnavölgyi Éva professzornőnk és Dr. Bácsi Attilának, a doktri megbeszélések során nyújtott hasznos tanácsokért és, hogy használhattam a time-lapse mikroszkópjukat. Köszönet illeti Dr. Buris Lászlót és sebész csoportját az Augusztia Klinikán, hogy biztosították a human zsírszövet mintákat a kísérleteinkhez. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Martin Wabitschnak és Dr. Pamela Fischer-Posovszkynak, hogy kísérleteinkhez használhattuk az SGBS sejtvonalukat és, hogy laboratóriumukban tölthettem egy hónapot Ulmban.

Mély hálámat szeretném kifejezni a kedves kollégáimnak és drága barátaimnak, Dr. Hodrea Juditnak, Dr. Demény Máténak, Dr. Csomós Krisztiánnak, Dr. Kajal Kanchannak, Dr. Gizem Aynának, Dr. Mihály Johannának, és Dr. Nagy Zsuzsannának. Mindig ott voltak és támogattak, tanácsokkal láttak el és sok kellemes időt töltöttünk együtt.

Legmélyebb hálával tartozom a családomnak és barátaimnak, akik végig mellettem álltak és támogattak átszegítve a nehéz időkön.

A legnagyobb köszönettel és hálával, a drága szüleimnek, Ildikónak és Szilárdnak valamint nagyszüleimnek tartozom, hogy feltétlen szeretetükkel türelmükkel támogattak és bíztattak és mindig ott voltak nekem.