

**A túlzott fruktóz bevitel jelentősen súlyosbítja a
magas zsírtartalmú diétával előidézett elhízás során
fellépő gyulladásos folyamatokat és metabolikus
elváltozásokat egérmodellben**

Rákóczi Bettina

Biológus MSc

2021. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Tóth E. Melinda

Belső konzulens: Dr. Szabó Renáta

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Bevezető.....	3
A nyugati típusú étrend.....	3
A zsírok metabolizmusa.....	4
A fruktóz metabolizmusa.....	5
Az elhízás során kialakuló gyulladás és a metabolikus szindróma	7
Célkitűzés	9
Anyagok és eszközök	10
Állatok	10
Orális glükóz tolerancia teszt.....	10
Szérum triglicerid koncentráció meghatározás	11
Szérum totál koleszterin koncentráció meghatározás	11
Szérum LDL koleszterin koncentráció meghatározás	11
Szérum HDL koleszterin koncentráció meghatározás.....	12
Szövetek hematoxin-eozin festése.....	12
RNS izolálás a szövetekből.....	12
Reverz transzkripció.....	13
qPCR	13
Doublecortin (DCX) festés	14
Statisztikai analízis.....	15
Eredmények és kiértékelésük	16
Az állatok testtömegének változása	16
Orális glükóz tolerancia teszt.....	16
Szérum triglicerid meghatározás	17
Szérum összkoleszterin.....	18

Szérum LDL-koleszterin.....	18
Szérum HDL-koleszterin	18
A máj morfológiai és génexpressziós változásai	19
Viszcerális fehér zsírszövet génexpressziós változásai	22
Barna zsírszövet vizsgálat eredményei	23
Agyszövet vizsgálatának eredményei	26
Összefoglalás	29
Köszönetnyilvánítás.....	31
Irodalomjegyzék	32

Bevezető

A nyugati típusú étrend

Napjainkban a különböző krónikus betegségek évente 41 millió ember halálát okozzák, ami az összes globális elhalálozás 74%-át teszi ki (WHO, 2022). Ezek a betegségek az életünk utolsó évtizedeiben jelennek meg, és jelentősen megrövidítik az egészséges élettartamunkat (Christ és mtsai., 2019). A legtöbb áldozatot a kardiovaszkuláris betegségek szedik, ezt követik a rák betegségek, majd a krónikus légzőszervi rendellenességek után a diabétesz. A krónikus betegségek kialakulásának esélyét növeli a dohányzás, a fizikai inaktivitás, a túlzott alkohol fogyasztás és a nem megfelelő étrend. Az egészségtelen táplálkozás és a fizikai aktivitás hiányának következtében emelkedhet a vérnyomás, megnőhet a vércukorszint, növekedhet a vér lipid tartalma és elhízás alakulhat ki (WHO, 2022).

A fejlett társadalmakra jellemző úgynevezett nyugati típusú étrend a feldolgozott élelmiszerek, gyors ételek, kényelmi ételek, mint a rágcálni valók, és cukros üdítők túlzott fogyasztását foglalja magába. Ez az étrend mindemellett alacsony rosttartalmú, valamint kevés vitamin és ásványianyag bevitellel jár. Továbbá nagy mennyiségben tartalmaz finomított cukrokat, sót, fehér lisztet, feldolgozott húskészítményeket, telített állati zsírokat és adalékanyagokat. Tehát összességében egy magas cukor- és zsírtartalmú táplálkozásról van szó. Többek között ezek az ételek azért egészségtelenek, mert magas az energia tartalmuk és a glikémiás indexük is, ami a vércukorszint és inzulin gyors megemelkedését eredményezik rövid idő alatt, ezt követően a tápanyagok elraktározódnak a zsírszövetbe. Ezek következtében az étrend, más kiegyensúlyozottabb táplálkozási módokkal szemben, rendkívül gyorsan elhízáshoz vezethet (Bhupathiraju és mtsai. 2014; Atkinson és mtsai. 2021). Ezen kívül egyre több állat- és humán kísérletben hozzák összefüggésbe a nyugati típusú diétát a gyulladásos markerek emelkedett szintjével (Lopez-Garcia és mtsai., 2004; Hosseini és mtsai., 2016). Manapság már elfogadott nézet, hogy a szövetspecifikus és szisztémás immunválasz, valamint a metabolikus szabályozás erősen összefügg egymással, ezért a megfelelő működésük függ a másiktól. Ebből következik az, hogy ha valami megzavarja ezt az immun-metabolikus homeosztázist, az számtalan krónikus metabolikus rendellenességhez vezethet, például elhízáshoz, 2-es típusú diabéteszhez, kardiovaszkuláris rendellenességekhez, neurodegeneratív és autoimmun betegségekhez (Christ és mtsai., 2019).

A zsírok metabolizmusa

A koleszterin és a zsírsavak az állati sejtek sejtmembránjának nélkülözhetetlen alkotóelemei, valamint számtalan biológiailag aktív molekula prekursorai. A zsírsavakból szintetizálódnak például az energia raktárként szolgáló trigliceridek és a szignál molekula szerepet játszó prosztaglandinok is. A koleszterin prekursor molekulája a szteroid hormonoknak és epesavaknak. Homeosztázisukat komplex visszacsatolási rendszer biztosítja transzkripcionális és poszttranszkripcionális mechanizmusokkal. A rendszer szabályozásának felborulása azonban könnyen elhízáshoz, 2-es típusú diabéteszhez és ateroszklerózishoz vezethet (DeBose-Boyd, 2018).

A zsírok anyagcseréje számos fontos és komplex biokémiai folyamatot igényel a szervezetben. Ide tartozik az emésztésük, abszorpciójuk, szintézisük valamint lebontásuk a szervezetben belül különböző enzimek segítségével (Liao és mtsai., 2021). A lipid metabolizmus elsődleges funkciója a lipidek szállítása a perifériás szövetek felé, majd a felesleges lipidek vissza transzportálása a májba újraelosztásra vagy kiürítésük érdekében (Gago és mtsai., 2018). A lipid metabolizmusnak három típusa létezik: exogén, endogén és reverz transzport (Remmerie és Scott, 2018). Az exogén útvonal esetén a lipidek a táplálékból származnak és kerülnek feldolgozásra. Az endogén útvonal során a lipidek a májban szintetizálódnak, majd lépnek be a lipid anyagcserébe. Reverz transzportról akkor beszélünk, mikor a szövetek számára felesleges lipidek összegyűjtődnek szállító molekulákba, és vissza transzportálódnak a májba (Phillips, 2014).

A táplálkozással bevitt zsírok a belekben szívódnak fel, majd a keringésben, hidrofób molekulák révén, nem önmagukban szállítódnak, hanem hidrofil molekulákon belül, ezeket hívjuk lipoproteineknek. Ezek különböző csoportokba sorolhatók méretük, lipid tartalmuk és apolipoprotein alkotói alapján (Feingold és Grunfeld, 2000). Először a zsírsavak trigliceridek formájában a koleszterinnel együtt kilomikron nevezetű szállító partikulumokba csomagolódnak a bélhámsejtek által, és a nyirokkeringésen keresztül jutnak át a keringésbe (Remmerie és Scott, 2018). A kilomikronok a zsírszövethez szállítódnak, ahol a lipoprotein lipáz hatására a bennük lévő trigliceridekből szabad zsírsavak hasítódnak. Ezeket felveszik a zsírsejtek. Az így kiürült kilomikronokat kilomikron maradványoknak hívjuk, melyeket a máj fog kiszűrni a plazmából (Willnow és mtsai., 1994).

Az endogén útvonal során a máj VLDL (*very low-density lipoprotein*) molekulákat szintetizál, melyekbe triglicerideket és koleszterint csomagol, melyek a perifériás szövetekhez szállítódnak. Ezeket a perifériás szövetek hidrolizálják lipoprotein lipáz segítségével IDL (*intermediate-density lipoprotein*) molekulává és szabad zsírsavakra. Ez utóbbiakat felveszik a

sejtek, míg az IDL molekulákat a hepatikus lipáz fogja hidrolizálni. Ezzel válik LDL (*low-density lipoprotein*) molekulává, mely főként koleszterint transzportál. Miután ezek a szállító molekulák a receptorukhoz kötnek, és kiürül a tartalmuk, egy részük hozzá kötődik a máj által szintetizált szabad apolipoprotein A molekulákhoz. Az apolipoprotein A segítségével képessé válik az LDL kötődni az extracelluláris mátrixhoz az erekben, ezzel lerakódást képezve, ami érlelmeszesedéshez vezethet (Feingold és Grunfeld, 2000; Nordestgaard és mtsai., 2010). A reverz transzportot a HDL (*high-density lipoprotein*) molekulák végzik, összeszedik a felesleges lipideket a periférián, és vissza szállítják a májba. Ez különösen a koleszterin homeosztázisa miatt fontos, mert a legtöbb perifériás sejt nem képes katabolizálni, ezért felgyűlhetnek (Phillips, 2014). A HDL által a májba szállított koleszterin az epébe ürül, majd eliminálódik a szervezetből (Bhatt és Rohatgi, 2016).

Az étkezéssel bevitt zsírokat tartják felelősnek a zsírszövet növekedéséért. Emberekkel folytatott tanulmányokban kimutatták, hogy magas zsírtartalmú étrend könnyedén elhízást okozhat (Bray és Popkin, 1998; Hill és mtsai., 2000; Jéquier, 2002; French és Robinson, 2003).

A fruktóz metabolizmusa

Fruktóz természetesen is megtalálható több gyümölcsben és zöldségben, így része a mindennapi táplálkozásunknak. Amióta 1957-ben rájöttek, hogy enzimatis úton a glükózból fruktóz állítható elő, az élelmiszeripar bevezette használatát (Marshall és Kooi, 1957). Ennek az az oka, hogy a fruktóz sokkal édesebb, mint a többi hexóz, emiatt széles körben használt édesítőszer feldolgozott élelmiszerekben és üdítőkben. 1970 óta magas fruktóz tartalmú kukorica szirup formájában adagolják az élelmiszerekhez, ami jelentősen megnövelte a táplálkozás során elfogyasztott napi mennyiségét (White, 2008).

A táplálékkal bevitt fruktóz lebontása a fruktolízis során történik. Annak ellenére, hogy a fruktolízis és a glükóz metabolizmusát szolgáló glikolízis több enzimen és metabolikus intermedieren osztozik, a fruktóz és a glükóz metabolizmusa eltérő. Míg a glükózt gyakorlatilag minden sejtünk képes metabolizálni, addig a fruktolízis folyamata feltételezhetően főleg a májban történik. Kis mennyiségű bevitel esetén metabolizálódik a vékonybélben glükózzá, de nagyobb mennyiségű bevitele során eléri a portális keringést, ahonnan nagyrészt kiszűri a máj. Ez utóbbi esetben is egy kis mennyiség megszökik a májtól, és a vesék, az agy vagy más szövetek által metabolizálódik (Jang és mtsai., 2018; Tappy és Rosset, 2019). A fő fruktóz transzporter a glükóz transzporter 2 (GLUT2), amelyen keresztül történhet glükóz és galaktóz felvétel is (Manolescu és mtsai., 2007). Az egyetlen ismert fruktóz specifikus transzportáló

fehérje a glükóz transzporterek családjában a GLUT5, mely csak a fruktózt képes transzportálni glükózt és galaktózt nem (Thorens és Mueckler, 2010; Douard és Ferraris, 2013). Ez a transzport fehérje molekula a vékonybélben lokalizálódik (Douard és Ferraris, 2008).

A májsejteken belül a fruktóz metabolizmusát a ketohexokináz, vagy más néven a fruktokináz kezdi meg. Ez foszforilálja fruktóz-1-foszfáttá, amit az aldoláz B hidrolizál dihidroxiaceton-foszfátra és glicerinaldehidre. Mindkettő beléphet a glikolízisbe vagy lipogenezisbe a továbbiakban, glicerinaldehid-3-foszfát formájában az előbbibe, míg glicerín-3-foszfátaként az utóbbiba. Ehhez a glicerinaldehidet glicerinné kell alakítani, amiből foszforilálással létrehozható a glicerín-3-foszfát, majd ebből keletkezik dihidroxi-aceton-foszfát, melyből glicerinaldehid-3-foszfát alakítható. Ezeket a folyamatokat több enzim is katalizálja (Krause és Wegner, 2020). Megfigyelték, ha egy mozgásszegény életmódot folytató egyén több napon keresztül fruktózban gazdag táplálkozást folytat, akkor ez stimulálni fogja a hepatikus de novo lipogenezist, megnöveli az intrahepatikus zsír és a vér triglicerid koncentrációját, valamint gátolja az inzulin hatását a hepatikus glükóz termelésre (Tappy és Rosset, 2019). Továbbá a fruktóz képes stimulálni a de novo lipogenezist az adipocitákban is, és az így termelődött szabad zsírsavak elszállítódnak a májba a portális keringésen keresztül (Varma és mtsai., 2015). A májban ezután oxidálódnak vagy észterifikálódnak trigliceridekké, és VLDL molekulákba csomagolódnak (Gibbons és mtsai., 2000).

Emellett a fruktóz kis mértékben a hexokináz által is metabolizálódhat (Johnson és mtsai., 2009). Ekkor fruktóz-6-foszfát lesz belőle, amit a glikolízisbe való belépés után a foszfofruktokináz foszforilál fruktóz-1,6-bisfoszfáttá. Ezt is az aldoláz enzim fogja lizálni, de ezúttal dihidroxi-aceton-foszfát és glicerinaldehid-3-foszfát keletkezik. A ketohexokináz által történő fruktóz degradációnak az az előnye ezzel szemben, hogy ezt a sebességmeghatározó lépést, amit foszfofruktokináz katalizál, megkerüli. Ezt az enzimet gátolja a magas ATP és citrát szint, melléktermékeinek szintje, valamint az alacsony pH és oxigén szint (Krause és Wegner, 2020).

Ezen két útvonal mellett van még egy lehetőség, melyen megindulhat a fruktóz metabolizmusa, a poliol anyagcsere útvonalon. Ekkor a fruktózból szorbitol intermediereken keresztül glükóz lesz két reverzibilis reakció segítségével. De ez megtörténhet fordítva is, ezzel endogén fruktózt előállítva (Lanaspa és mtsai., 2014). Például magas glükóz bevitel során telítődik a hexokináz enzim, ezért ekkor a glükóz belép erre az alternatív anyagcsere útvonalra (Berrone és mtsai., 2006). A májban történő fruktolízis elsődleges metabolitjai és melléktermékei a glükóz, laktát, szabad zsírsavak, VLDL, húgysav és metilglioxál. Ezek képesek megzavarni az extrahepatikus szöveteket és szerveket. Továbbá a fruktóz túlzott

bevitelle során a gyors fruktolízis ATP depléciót okozhat, ami gyulladásos választ és oxidatív stresszt vált ki (Spagnuolo és mtsai., 2021). Ezek következményeképpen abnormális mennyiségben fog termelődni az inzulin, gyulladásos citokinek és a leptin (Zhang és mtsai., 2017).

Az elhízás során kialakuló gyulladás és a metabolikus szindróma

A metabolikus szindróma esetén több rendellenesség együttesen fordul elő, ide tartozik a glükóz intolerancia vagy inzulin rezisztencia, az abdominális elhízás, a diszlipidémia (hipertrigliceridémia, csökkent HDL koleszterin) és a magas vérnyomás (DeFronzo és Ferrannini, 1991). A betegség előfordulása magas és egyre növekszik, köszönhetően a nyugati típusú életstílusnak (Soares és Costa, 2009). Ennek az életmódnak a fő negatív komponensei a hosszú távú, állandóan jelen lévő stressz, pozitív energia mérleg, vagyis túlzott energia bevitel és alacsony fizikai aktivitás, valamint az alacsony minőségű táplálék, ami magas zsírtartalmú és energiadús, ugyanakkor mikrotápanyagokban szegény (Soares és Costa, 2009).

Fiziológiás körülmények között egy organizmus immunrendszere gyulladásal válaszol egy káros stimulusra, ami lehet fizikai, kémiai vagy biológiai is (Qatanani és Lazar, 2007). A metabolikus szindróma során fennálló gyulladásos állapot sajátossága, hogy nem előzi meg fertőzés, autoimmun folyamat, sem masszív szöveti sérülés, ami indokolná a gyulladás megjelenését. Továbbá a gyulladásos aktiváció mértéke sem túl nagy, hanem egy állandóan fennálló alacsony szintű krónikus gyulladás jellemző (Hotamisligil, 2006). Kutatók megfigyelték, hogy elhízás során a zsírszövet a túlzott táplálékbevitelre immunválasszal reagál, de a gyulladást kiváltó jel még ismeretlen (Kawai és mtsai., 2021).

A fehér zsírszövet a fő zsírraktárunk és emellett a legnagyobb endokrin szervünk, ami adipokineket és citokineket termel. Az adipokinek különböző metabolikus és fiziológiás kaskád folyamatokban játszanak szerepet, valamint szabályozzák az inzulin szignalizációt, glükóz felvételt, zsírsavak oxidációját, és egyéb metabolikus folyamatokat (Wildman és mtsai., 2008). A súlygyarapodás és az elhízás a fehér zsírszövetben fenotípus váltást idéz elő, amelyben megjelennek a gyulladt, diszfunkcionáló adipociták, valamint az infiltrálódó immunsejtek (Stefan és mtsai., 2009; Wildman, 2009). A gyulladt adipociták által szekretált gyulladásos citokinek megzavarják az egészséges zsírszövet és a környező szervek normál funkcióját (Alberti és Zimmet, 1998). Ettől a ponttól kezdve a zsírszövet nem csak szekréciós- de immunszervnek is tekinthető, az elhízás pedig egy gyulladásos immunrendszeri rendellenességnek (Kawai és mtsai., 2021).

Az abdominális zsírszövetnek két fajtáját különböztetjük meg, a szubkután zsírszövetet, ami a bőr alatti zsírszövet, valamint a vizszerálisat, ami alatt a hashártyán belül elhelyezkedő zsírszövetet értjük (Bastard és mtsai., 2000). Elhízás és inzulin rezisztencia során megfigyelték, hogy a vizszerális fehér zsírszövet adipocitái nagyobb mértékű hipertrófiát mutattak a szubkután fehér zsírszövethez képest emberben és állatmodellekben is (Huynh és mtsai., 2002; Lawrence és Gilroy, 2007; Nijhuis és mtsai., 2009). Továbbá a vizszerális fehér zsírszövetben a szubkutánnal összehasonlítva nagyobb számú makrofág jelenlétéről számoltak be korábbi tanulmányokban elhízott emberben és állatmodellekben is (Bastard és mtsai., 2000; Bellingan és mtsai., 2002; Kopp és mtsai., 2005; Monteiro és Azevedo, 2010). A gyarapodó fehér zsírszövetben a szöveti makrofágok iniciálják más immunsejtek toborzását, és citokinek termelésével szabályozzák a gyulladásos jelátviteli kaszkádot (Raetz, 1990; Baud és Karin, 2001). Az aktivált szöveti makrofágok a fő forrásai olyan gyulladásos mediátoroknak, mint a TNF α és az IL-6 (Raetz, 1990). Szerepük jelentőségét az egész szervezet metabolizmusára nézve bizonyítja egy tanulmány, melyben csendesítették siRNS-sel specifikusan a zsírszöveti makrofágok TNF α termelését, aminek hatására javult az inzulin szenzitivitás és a glükóz tolerancia a kísérleti állatokban (Rattarasarn és mtsai., 2003). Azonban nem csak a makrofágoknak van szerepük a zsírszövet gyulladásának kialakulásában, hanem a neutrofil granulocitáknak és limfocitáknak is (Blackburn és mtsai., 2006; Monteiro és Azevedo, 2010). Állatkísérletekben kimutatták, hogy vékony egereknél alkalmazott zsírdús diéta hatására nagyon korai neutrofil infiltráció detektálható a vizszerális fehér zsírszövetben, még mielőtt kialakulna inzulin rezisztencia vagy elhízás (Hassanali és mtsai., 2010). Ezek a neutrofil sejtek kezdeményezhetik makrofágok toborzását, majd együttműködve az adipocitákkal, IL-1 β termelésével és a makrofágok közreműködésével okozhatják a fehér zsírszövet gyulladását (Aeberli, 2008; Hassanali és mtsai., 2010). Ezt a neutrofil sejtek által dominált korai gyulladásos kaszkádot gondolják a májban kialakuló inzulin rezisztencia és a metabolikus diszfunkciók okozójának egyes kutatók (Aeberli és mtsai., 2006; Alvarez és mtsai., 2009).

Célkitűzés

A kutatás célja zsírdús diéta, illetve a magas zsír és fruktóz tartalmú étrend által kiváltott elhízás során kialakuló krónikus gyulladás és metabolikus elváltozások vizsgálata volt egérmodellben. Emellett arra is kerestük a választ, hogy milyen különbségek lehetnek a zsírdús, valamint a nyugati étrendet jobban modellező magas zsír- és fruktóz tartalmú étrend hatásai között.

A céljaink elérése érdekében a következő vizsgálatokat hajtottuk végre:

- Egerek egy csoportját 5 hónapig zsírdús étrenden, egy másik csoportjukat magas zsír- és fruktóztartalmú diétán tartottunk.
- A kezelés teljes időtartama alatt monitoroztuk az állatok testtömegét.
- Orális glükóz tolerancia teszttel felmértük a szervezetük glükóz toleranciáját.
- Kolorimetriás tesztekkel meghatároztuk a szérum minták triglicerid, összkoleszterin, LDL- és HDL-koleszterin koncentrációját.
- Megmértük az állatok barna zsírszövetének, májának és agyának tömegét, valamint ugyanezekből a szervekből és a fehér zsírszövetből RNS-t izoláltunk, majd megvizsgáltuk az esetleges génexpressziós változásait qPCR módszerrel.
- Továbbá metszeteket készítettünk az agyszövetből, a barna zsírszövetből és a májszövetből, majd az agymetszeteken doublecortin festést, a barna zsír- és májmetszeteken hematoxin-ezoin festést alkalmaztunk.

Anyagok és eszközök

Állatok

A kutatás célja az elhízás során kialakuló gyulladásos folyamatok vizsgálata zsírdús diétán (HFD - *high fat diet*), illetve a nyugati étrendet jobban mintázó magas zsír- és fruktóz tartalmú diétán (HFD+F – *high fat and fructose diet*) tartott egerekben, valamint a két étrend hatásainak összehasonlítása. Ennek megfelelően a kísérlethez felhasznált hím C57BL6/J egerek 3 csoportba oszthatók. Ahogy ez az 1. táblázatban látható a csoportokba 14, illetve 15 egyed tartozott. A kontroll normál tápot kapott ivóvízzel, az egyik kezelt csoport magas zsírtartalmú tápot és ivóvizet, míg a harmadik csoport magas zsírtartalmú tápot, illetve 30%-os fruktóz tartalmú oldatot kapott ivóvíz helyett. A kezelést 3 hónapos korukban kezdtük meg és 5 hónapig folytattuk. A tápot és a vizet, illetve fruktóz oldatot igény szerint fogyaszthatták. A testtömegüket minden 4. héten megmértük. Glükóz tolerancia tesztet 5 hónap elteltével végeztünk. Az egerek 8 hónapos korukban kerültek feldolgozásra, mely során szérum mintát vettünk és különböző szerveiket eltettük. Az állatkísérleti engedélyünk (XVI./847/2022.) Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által jóváhagyott.

	Nem	Étrend	Darabszám
Kontroll	Hím	Normál táp + víz	14
Magas zsírtartalmú étrend	Hím	Zsírdús táp + víz	15
Nyugati étrend	Hím	Zsírdús táp + 30% fruktóz oldat	14

1.Táblázat: A kísérlethez felhasznált egerek

Orális glükóz tolerancia teszt

Orális glükóz tolerancia tesztet mértek fel az állatok szervezetének glükóz toleranciáját. A teszt elvégzését megelőzően az állatok 5 napon át kézhez lettek szoktatva, valamint 2 napig minden nap be lettek helyezve a kalodába és meg lett szűrva a farkuk, annak érdekében, hogy az állatok megszokják a folyamatot, így minimálisra csökkenjen a teszt elvégzése által kiváltott stressz. A diéta kezdete után 5 hónap elteltével végeztük a tesztet, ami előtt az állatok 12 órán

keresztül éheztetve voltak. AccuCheck készülék segítségével ellenőriztük a vércukorszintjük. A művelethez az állatokat kalodába helyeztük és a laterális farok vénát megszúrva vettünk vért tőlük. Majd egy csepp vért helyeztünk a vércukorszintmérő tesztsíkra, így kaptuk meg a 0. időpillanat értékét. Ezután kivettük az állatokat a kalodából és gyomorszondával 2 g/kg glükózt juttattunk be oldatban. Ezt követően 30, 60 és 120 perc elteltével ismét vért vettünk a laterális farok vénájukból és ellenőriztük a vércukorszintjüket.

Szérum triglicerid koncentráció meghatározás

Enzimatisz kolorimetriás teszttel végeztük a szérum minták triglicerid koncentrációjának a mérését (Diagnosticum Zrt, Triglicerid PAP). A szérum mintákból és standardból, valamint vakból 2 párhuzamos mérés történt. Desztillált vizet használtunk vak mintának. Wellenként 3 µl-t vittünk fel az előbbiekből, majd 300 µl reagenst adtunk hozzájuk. Ezt 15 perc inkubáció követte 37 °C-on rázatva, végül 493 nm-es hullámhosszon 1 cm fényút hosszal végpontos mérést végeztünk a minták abszorbanciájának meghatározásához.

Szérum totál koleszterin koncentráció meghatározás

A szérum totál koleszterin koncentrációjának vizsgálatát enzimatisz kolorimetriás módszerrel végeztük (Diagnosticum Zrt, koleszterin PAP). Két párhuzamos mérést végeztünk. A standardból három tagú felezős hígítási sorozatot készítettünk desztillált vízzel. Desztillált vizet használtunk vaknak. Mindenből 3 µl-t mértünk ki wellenként, majd ezekhez hozzá mértünk 300 µl reagenst és 10 percet inkubáltuk 37 °C-on rázatva. A minták abszorbanciáját 493 nm-es hullámhosszon mértük 1 cm fényúttal végpontosan.

Szérum LDL koleszterin koncentráció meghatározás

Direkt enzimatisz kolorimetriás teszttel végeztük az LDL koleszterin koncentráció szint mérését (Diagnosticum Zrt, LDL koleszterin direkt). A tesztet szérum mintákkal végeztük, vaknak desztillált vizet használtunk. A kitben található kalibrációs oldatot 500 µl desztillált vízzel készítettük el, majd hat lépcsős hígítási sort állítottunk elő belőle. Az összes mintával 2 párhuzamos mérést végeztünk. A szérumból, vakból és hígítási sor tagjaiból 3 µl-t vittünk fel wellenként, majd hozzájuk adtunk 270 µl reagenst és inkubáltuk 5 percet 37 °C-on rázatva. Az inkubáció letelte után minden wellbe 90 µl R2 reagenst pipettáztunk. Ezt az elegyet 15 percig inkubáltuk rázatva, 37 °C-on. A minták abszorbanciáját 596 nm-es hullámhosszon 1 cm-es fényúton végpontos méréssel határoztuk meg.

Szérum HDL koleszterin koncentráció meghatározás

A szérum minták HDL koncentráció meghatározását direkt immungátlásos kolorimetriás teszttel végeztük (Diagnosticum Zrt, HDL koleszterin direkt). A kalibrációs oldatot 1,5 ml desztillált vízzel készítettük el, majd ebből állítottunk elő 6 lépcsős felezős hígítási sorozatot. Vaknak desztillált vizet alkalmaztunk. Szérum mintáinkat vortexeltük, mielőtt vettünk belőlük. A méréshez a szérum mintákból, hígítási sorozatból és desztillált vízből 3 µl-t használtunk wellenként. Minden mintából két párhuzamos mérést végeztünk. Az előkezelő oldatból (R1) minden mintához 270 µl-t mértünk és inkubáltuk 5 percet rázatva. Az inkubációs idő leteltével a mintákhoz mértük a 90 µl enzim reagenst (R2), melyet 15 perc inkubáció követett rázatva 37 °C-on. Az abszorbanciaértékeket 596 nm-es hullámhosszon 1 cm fényúttal 37 °C-on végpontosan méréssel határoztuk meg.

Szövetek hematoxin-eozin festése

Az kezelés végén kivettük az állatok máját, valamint az interscapularis barna zsírszövetét, és megmértük a tömegüket, majd 4%-os paraformaldehid oldatba helyeztük őket. Ezt követően a mintákat elküldtük a Patológia Intézetbe, ahol paraffinba lettek ágyazva és 3 µm-es metszetek készültek belőlük. Ezeken hematoxin-eozin festés lett alkalmazva, hogy láthatóvá váljon a szövetek struktúrája.

RNS izolálás a szövetekből

Az RNS izoláláshoz NucleoSpin RNA/protein purification kitet használtunk. A felhasznált szöveteket RNA later oldatban tároltuk. Az izolálást agyszövetből, mely nem tartalmazott kisagyat, 30-35 mg májszövetből, barna zsírszövetből és 120-150 mg viscerális zsírszövetből végeztük. A szövetek homogenizálása RP1 puffert és β-merkaptoethanolt 100:1 koncentrációban tartalmazó elegyben történt. Ebből az agyszövethez 2 ml-t alkalmaztunk mintánként, májszövet esetén 500 µl-t, barna zsírszövet esetén 750 µl-t, míg viscerális zsírszövetnél 1 ml-t. A homogenizálást potterrel végeztük, majd NucleoSpin Filter oszlopon (ibolya színű gyűrű) szűrtük a mintákat centrifugában 1 percig 13000 RPM-en. Az oszlopokat eltávolítottuk és 1 egységnyi 70%-os szobahőmérsékletű etanolt adtunk a mintákhoz, majd szuszpendáltuk ezeket. Ezt követően nukleinsav kötő oszloppal (NucleoSpin RNA/Protein column) szűrtük a mintákat centrifugálással 1 percig 13000 RPM-en. Kikevertük az rDNase reakció mixet, mely 90 µl rDNase pufferből és 10 µl rDNase-t tartalmaz mintánként.

Centrifugálást követően lebontottuk a minta DNS tartalmát 95 µl mix adagolásával mintánként, majd 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután háromszor mostuk a mintánkat, először 200 µl RA2 pufferrel centrifugáltuk a mintákat 1 percig 13000 RPM-en, másodszor 600 µl RA3 pufferrel centrifugáltuk 1 percet 13000 RPM-en, harmadszor 250 µl RA3 pufferrel centrifugáltuk 2 percet 13000 RPM-en. Az RNS eluálását az oszlopról 60 µl RNase mentes vízzel centrifugálással hajtottuk végre 1 percig 13000 RPM-en és az átfolyóval ismét végeztünk eluálást. NanoDrop spektrofotométerrel mértük meg az RNS koncentrációját a mintáinknak, majd cDNS-sé írtuk át.

Reverz transzkripció

Az RNS mintákat High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével írtuk át cDNS-sé. A reakcióhoz 1 µg (15 µl) RNS, 1,5 µl reverz transzkriptáz, 3 µl primer, 1,2 µl dNTP, 6,3 µl RNáz mentes víz, 3 µl puffer szükséges. A 30 µl-es össztérfogatú reakció elegy reverz transzkripciójának paraméterei: inkubáció 10 percig 25 °C-on, reverz transzkripció 2 óra 37 °C-on, inaktiváció 5 percig 85 °C-on. A mintákat 20-szorosára hígítottuk tisztított vízzel.

qPCR

A qPCR reakciólegy tartalma: 9 µl cDNS, 9 µl Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems) 1 µl primer. Belső kontrollnak egér aktin vagy GAPDH gént alkalmaztunk. Az általunk használt forward és reverse primereket a 2. táblázat tartalmazza. A qPCR program paraméterei a következők: denaturáció 10 perc 95 °C-on, denaturáció 15 másodperc 95 °C-on, annealing és elongáció 60 másodperc 60 °C-on. Az utolsó 3 lépés 39 ciklusban ismétlődik. A reakció futtatása Rotor Gene 3000 instrument (Corbet Research) gépben történt.

Az eredmények kiértékelése során először ki kell vonnunk a belső kontroll CT értékét a minták CT értékéből, ezzel megkapjuk a ΔCT értéket. A kapott ΔCT értékeket csoportonként átlagoljuk, majd a kontroll csoport ΔCT értékéből kivonjuk külön mindkét kezelt állatcsoport ΔCT értékét, így megkapjuk a $\Delta\Delta CT$ értékeket. Ezt követően a $2^{-\Delta\Delta CT}$ képletet használva kiszámoltuk a génexpressziós szint változás mértékét. Végül százalékban kifejezve szemléltettük a génexpressziós szint változásokat, ahol tehát az egészséges kontroll volt a 100%.

	gén	forward primer	reverz primer
1	<i>Gapdh</i>	GGGTTCTATAAATACGGACTGC	CCATTTTGTCTACGGGACGA
2	<i>Lep</i>	GTGGCTTTGGTCCTATCTGTC	CGTGTGTGAAATGTCATTGATCC
3	<i>Fgf21</i>	GTGTCAAAGCCTCTAGGTTTCTT	GGTACACATTGTAACCGTCCTC
4	<i>Nampt</i>	GCAGAAGCCGAGTTCAACATC	TTTTACGGCATTCAAAGTAGGA
5	<i>Rarres2</i>	GCCTGGCCTGCATTAAATGG	CTTGCTTCAGAATTGGGCAGT
6	<i>Tnf</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
7	<i>Il1b</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
8	<i>Tgfb1</i>	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
9	<i>Il10</i>	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
10	<i>Lepr</i>	AGCTAGGTGTAACTGGGACA	GCAGAGGCGAATCATCTATGAC
11	<i>Cd36</i>	TTGAAAAGTCTCGGACATTGAG	TCAGATCCGAACACAGCGTA
12	<i>Insr</i>	TCAAGACCAGACCCGAAGATT	TCTCGAAGATAACCAGGGCATAG
13	<i>Irs1</i>	CGATGGCTTCTCAGACGTG	CAGCCCGCTTGTTGATGTTG
14	<i>Ucp1</i>	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
15	<i>Cox8b</i>	TGTGGGGATCTCAGCCATAGT	AGTGGGCTAAGACCCATCCTG
16	<i>Cidea</i>	TGACATTCATGGGATTGCAGAC	GGCCAGTTGTGATGACTAAGAC
17	<i>ApoA5</i>	GTGCTGCTGTCCCAACCTA	CTGAGTGTAATGCCCTGAGT
18	<i>AdipoR1</i>	TGGTCTTCGGGATGTTCTTC	CCCTGAATAGTCCAGTTTGGAA
19	<i>Ldlr</i>	GTGGCTGAAAACCTCTTGTC	CACACCAGTTCACCCCTCTA
20	<i>Leap</i>	TGCCAAGATGCTACAGCTAAA	GGGGAACATTGACCTGACCC
21	<i>Esrra</i>	CGGAGCCCAAGGTGACCAG	ACCCTTTGGACTGTCAGGACT
22	<i>LipC</i>	CCCTGGCATACCAGCACTAC	ACTTCGCAGATTCTCCAGC
23	<i>P62</i>	GAAGTCGCTATAAGTGCAAGTGT	AGAGAAGCTATCAGAGAGGTGG
24	<i>LC3</i>	GACCGCTGTAAGGAGGTGC	CTTGACCAACTCGCTCATGTTA
25	<i>Hsp25</i>	ATCCCCTGAGGGCACACTTA	GGAATGGTGATCTCCGCTGAC
26	<i>FNDC5</i>	TTGCCATCTCTCAGCAGAAGA	GGCCTGCACATGGACGATA
27	<i>IL6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
28	<i>Ab cryst</i>	GTTCTTCGGAGAGCACCTGTT	GAGAGTCCGGTGTCAATCCAG
29	<i>Hsp70</i>	GAGATCGACTCTCTGTTTCGAGG	GCCCGTTGAAGAAGTCCTG
30	<i>GFAP</i>	CGGAGACGCATCACCTCTG	AGGGAGTGGAGGAGTCATTCTG
31	<i>Iba1</i>	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	CAGCATTCGCTTCAAGGACATA
32	<i>Trem2</i>	CTGGAACCGTCACCATCACTC	CGAAACTCGATGACTCCTCGG
33	<i>Pgp</i>	AATGTTTCGTTATGCAGGTTGGC	TGGCTCTTTTATCGGCCTCAC
34	<i>BDNF</i>	GCATCTGTTGGGGAGACAAG	TCACCTGGTGGAAATTGTG
35	<i>Glut1</i>	GGATCCCAGCAGCAAGAAG	CCAGTGTTATAGCCGAACCTGC
36	<i>Mrc1</i>	CCACAGCATTGAGGAGTTTG	ACAGCTCATCATTTGGCTCA
37	<i>Arg1</i>	GAATCTGCATGGGCAACC	GAATCCTGGTACATCTGGGAAC
38	<i>Actb</i>	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA

2.Táblázat: A qPCR vizsgálathoz felhasznált primerek

Doublecortin (DCX) festés

Az állatok agyának a felét fixáltuk 3%-os paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M-os foszfát pufferben. Ezt követően átraktuk őket felszálló (10% - 20% - 30%) cukoroldat sorba és 4 °C-on tartottuk felhasználásig. Fagyasztó mikrotóm segítségével 20 µm-es agymetszeteket készítettünk. Tarolásuk 0,1% azidot tartalmazó PBS-ben történt 4 °C-on. A doublecortin festés úsztatott metszeteken történt. Először háromszor 5 percet PBS-sel mostuk a mintákat, majd 500

μ l 30%-os H_2O_2 -ot pipettáztunk rájuk, és 30 percet inkubáltuk szobahőn. Ez után PBS-sel háromszor 5 perces mosást követően blokkoltuk, BSA-t és tritont tartalmazó PBS-ben 30 percet szobahőn. Következő lépésként blokkolóban feloldottunk az elsődleges ellenanyagot 1:4000-re hígítva, majd a mintákra mértük, és egy éjszakát inkubáltuk 4 °C-on. Másnap háromszor 5 perces PBS-es mosással kezdtünk, majd blokkolóban feloldott 1:1000-re hígított másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a mintákat 1 órát szobahőn. Ezt háromszor 5 perces PBS-es mosás követte, majd 1:500-ban PBS-sel hígított ABC komplexet adtunk a metszetekhez, és 1 órát inkubáltuk szobahőn. Ezt újabb háromszor 5 perces PBS-es mosás követte, majd 30%-os H_2O_2 -ot tartalmazó TBS-sel hígított DAB-ot mértünk a mintákra, és 30 percet inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő leteltével végül háromszor 10 perces PBS-es mosást végeztünk. A metszeteket tárgylemezre húztuk desztillált vízből. Miután megszáradtak lefedtük őket DPX-szel, és szobahőmérsékleten szárítottuk. A metszetek scannelve lettek és QuantCenter program segítségével elemeztük.

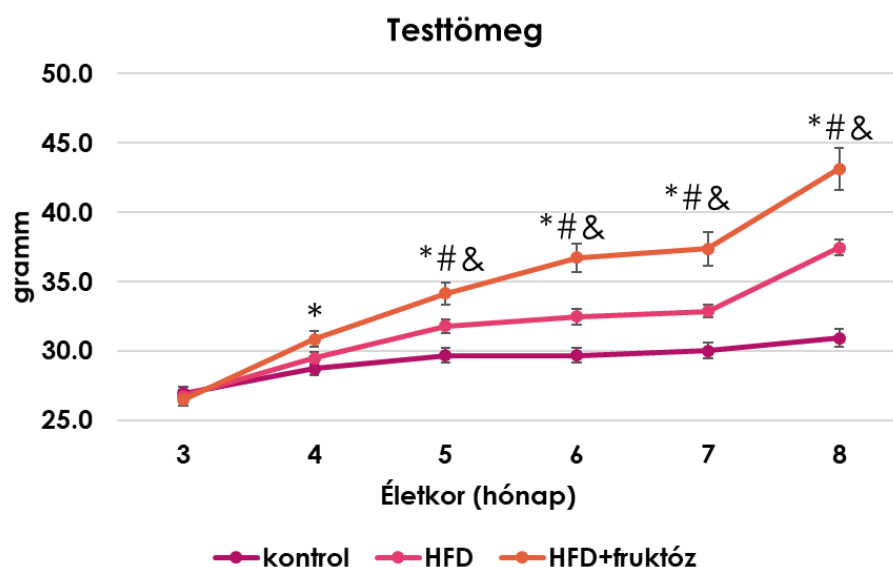
Statisztikai analízis

Az eredményeink statisztikai kiértékeléséhez SigmaPlot programmal ANOVA (analysis of variance, varianciaanalízis) analízist használtunk, majd Bonferroni post hoc tesztet végeztünk. A szignifikancia határértéke $p < 0,05$ volt a vizsgálataink során.

Eredmények és kiértékelésük

Az állatok testtömegének változása

A kísérlet során zsírdús diétával, illetve zsírdús és magas fruktóz tartalmú diétával indukáltunk elhízást hím vad típusú C57BL6/J egerekben. Kontrollnak normál tápon nevelt vad típusú C57BL6/J hímeket használtunk. Öt hónap diétát követően mindkét kezelt állatcsoport testtömege a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb értéket mutatott (1. ábra). Megfigyelhető, hogy a zsírdús diéta fruktózzal való kiegészítésének hatására szignifikánsan nagyobb mértékű volt a testtömeg gyarapodás, tehát az elhízás mértéke súlyosabb.



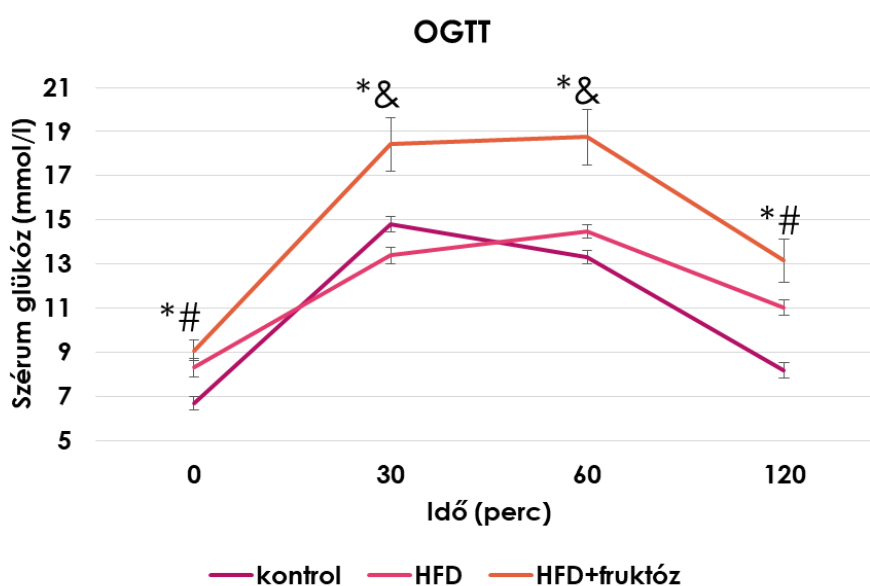
1. ábra Állatok testtömegének vizsgálata

Az állatok testtömeg változása az étrendek hatására. Zsírdús diéta – *high fat diet* (HFD). Magas zsír- és fruktóz tartalmú diéta – *high fat and fructose diet* (HFD+F). Normál táp - kontroll. Átlag $\pm$ SEM. ANOVA, Bonferroni post hoc teszt. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs. HFD; * Kontroll vs. HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: $n=14$; HFD: $n=15$; HFD+F: $n=14$

Orális glükóz tolerancia teszt

A nagymértékű elhízás miatt feltételeztük, hogy a diéták hatására inzulinrezisztencia alakul ki a kezelt állatokban, ezért a kísérlet végén orális glükóz tolerancia tesztet végeztünk. A mérés eredményei azt mutatják, hogy az állatok éhgyomri vércukorszintje (0. perc) mindkét kezelt csoportban szignifikáns mértékben megemelkedett a kontrollhoz képest (2. ábra). A

glükóz oldat beadása után a várakozásnak megfelelően mindhárom csoportban megnőtt a vércukorszint. Azonban érdekes módon a 30, illetve 60 percben nem volt szignifikáns különbség a kontroll és a zsírdús tápon tartott csoport értékei között, míg a fruktózt is kapó állatok vércukorszintje a másik két csoporthoz viszonyítva drasztikusan magasabb volt. A 120. percre az egészséges állatok vércukorszintje visszaállt a kezdeti értékre, míg az elhízott csoportokban egy magasabb szinten maradt. Az eredmények alapján tehát a csak zsírdús tápon nevelt állatokban az elhízás ellenére még nem alakult ki jelentős mértékű glükóz intolerancia. Ezzel szemben a nyugati étrenden nevelt csoport szérumban glükóz szintje minden időpillanatban szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontrollal összevetve, ami glükóz intoleranciára utal.



2. ábra Állatok orális glükóz toleranciájának vizsgálata

Orális glükóz tolerancia teszttel mértük az állatok glükóz toleranciáját. Átlag $\pm$ SEM. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs. HFD; * Kontroll vs. HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: $n=14$; HFD: $n=15$; HFD+F: $n=14$

Szérumban triglicerid meghatározás

A metabolikus szindróma egyik fontos tünete a diszlipidémia, ezért az állatok szérumban triglicerid és koleszterin szintjét is megvizsgáltuk kolorimetriás tesztek segítségével. A triglicerid szintek tanulmányozásakor megfigyeltük, hogy nincs szignifikáns különbség a zsírdús, illetve magas zsír- és fruktóz tartalmú diétával etetett csoportok és a kontroll között (3.A ábra). Továbbá a két elhízott csoport értékei közt sem észlelhető szignifikáns eltérés a kezelés hatására. Tehát az elhízás ellenére egyik diéta következményeképpen sem alakult ki hipertrigliceridémia.

Szérum összkoleszterin

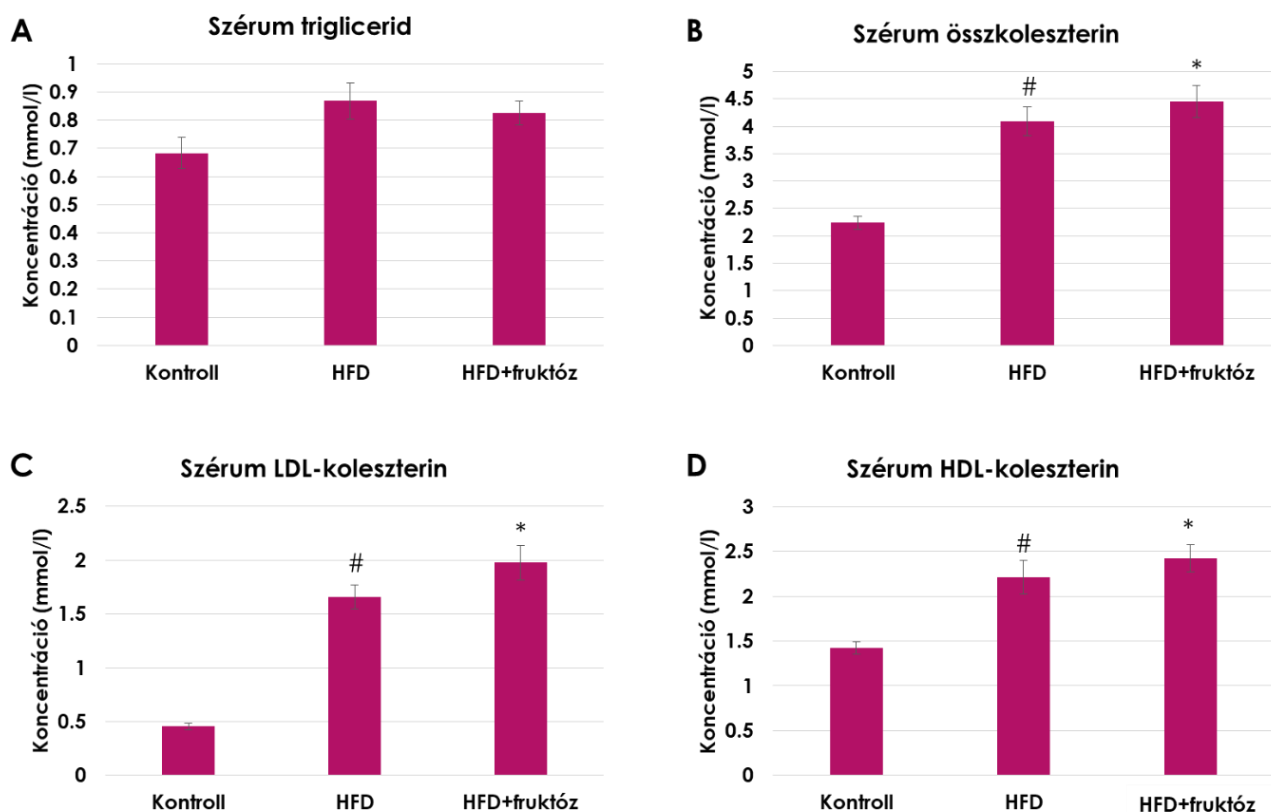
A triglicerid szinttel ellentétben az összkoleszterin szint vizsgálata azt mutatta, hogy mind a zsírdús diéta alkalmazása, mind a nyugati étrend szignifikánsan, közel kétszeresére növelte a szérum összkoleszterin szintet az egerekben (3.B ábra). Érdekes módon, annak ellenére, hogy a két etetett csoport testsúlya és vércukorszintje jelentősen eltért egymástól, összkoleszterin szintjükben nem észlelhető statisztikailag releváns eltérés.

Szérum LDL-koleszterin

Az összkoleszterin mellett külön-külön is megmértük az egerek szérum LDL- és HDL-koleszterin szintjét. A vizsgálat során megállapítottuk, hogy a zsírdús diétán nevelt csoport LDL-koleszterin koncentrációja szignifikánsan magasabb lett a normál tápon tartott csoporthoz képest (3.C ábra). A magas zsír- és fruktóz tartalmú étrend kezelés is szignifikánsan magasabb koncentráció értéket eredményezett. A zsírdús diéta fruktózzal való kiegészítése azonban nem okozott további szignifikáns növekedést.

Szérum HDL-koleszterin

Hasonló változásokat tapasztaltunk a szérum HDL-koleszterin szint vizsgálatakor is. A kontrollhoz képest a zsírdús diéta megemelte a HDL-koleszterin koncentrációját az egerek szérumában (3.D ábra). Ehhez hasonlóan a nyugati típusú étrend is szignifikáns koncentráció emelkedést idézett elő a mintákban. A zsírdús, illetve magas zsír- és fruktóz tartalmú diétán nevelt egerek HDL-koleszterin szint értékei közt nem volt statisztikailag releváns különbség. Embernél az általunk használt étrendek alkalmazása esetén csökkenést várnánk a HDL-koleszterin szintben. Azonban az emberekkel szemben az egerek fő koleszterin szállító lipoprotein partikuluma nem az LDL, hanem a HDL (Glass, 2006), ami magyarázhatja eredményünket.



3. ábra Vércsír értékek vizsgálata

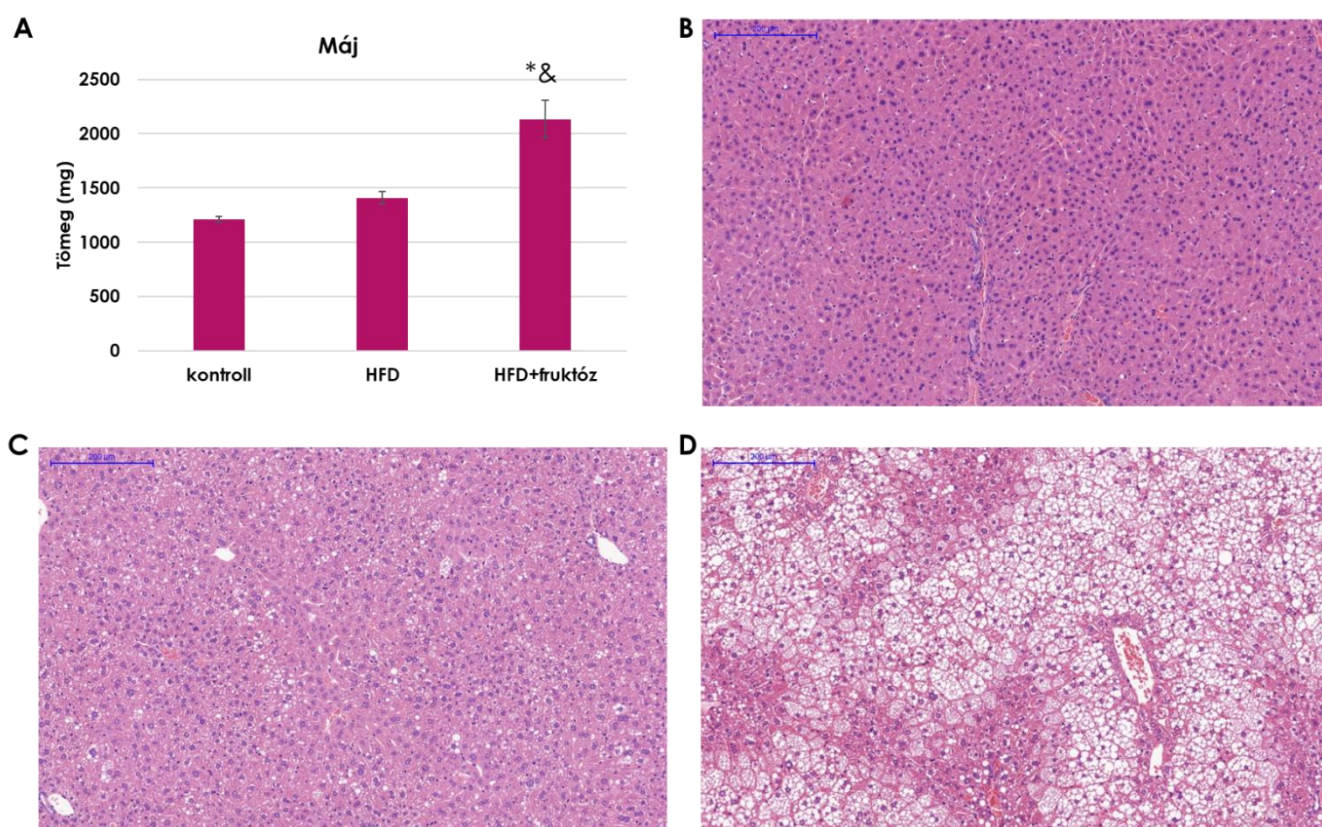
Kolorimetriás teszttel meghatározott szérum triglicerid (A), összkoleszterin (B), LDL- (C) és HDL- (D) koleszterin koncentrációk. Átlag $\pm$ SEM. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs. HFD; * Kontroll vs. HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: $n=14$; HFD: $n=15$; HFD+F: $n=14$

A máj morfológiai és génexpressziós változásai

A lipidek metabolizmusában kulcsfontosságú a máj megfelelő működése. Elhízás során zsírok rakódnak a májszövetbe, nem alkoholos zsírmáját előidézve (Powell és mtsai., 2021). Ezért állapotának tanulmányozása érdekében megmértük a szerv tömegét, majd feltérképeztük qPCR módszerrel a relatív génexpressziós változásokat. Csak magas zsírtartalmú étrend hatására nem változott jelentősen a szerv tömege (4.A ábra). Azonban a nyugati étrendet mintázó diéta szignifikánsan nagyobb tömegnövekedést eredményezett a kontrollhoz és a másik kezelt csoporthoz képest is, ami zsírmáj kialakulására utalhat.

Annak érdekében, hogy lássuk rakódtak-e lipid cseppek a májba, hematoxin-eozin festést alkalmaztunk (4.B,C,D ábra). Megfigyelhető, hogy a kontrollhoz (4.B ábra) képest már zsírdús étrend hatására is történt lipid akkumuláció (4.C ábra), azonban magas zsír- és fruktóz tartalmú diéta hatására a mennyisége jelentősen megnövekedett (4.D ábra). A szövettani

eredmények megerősítik, hogy fruktóz együttes adásával sokkal súlyosabb mértékű zsírmáj alakul ki az állatokban, mint a tisztán zsírdús diéta hatására.



4. ábra Máj tömeg és hisztológia

Állatok májtömege (A). A máj struktúráját hematoxilin-esoin festéssel tettük láthatóvá. B – kontroll, C – HFD, D – HFD+F. Átlag $\pm$ SEM. Mércse: 200 μ m. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs. HFD; * Kontroll vs. HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: n=14; HFD: n=15; HFD+F: n=14

Következő lépésben ezért megvizsgáltuk a máj működésében, a zsírmáj kialakulásában és a gyulladásban szerepet játszó gének expressziójának változását is qPCR segítségével, aminek eredményei az 5. ábrán láthatóak. A vizsgálat során azt vettük észre, hogy mindkét csoportban szignifikáns mértékben több lipoproteinlipáz enzim és CD36 receptor fehérje expresszáldott a kontrollhoz képest, azonban mindkét gén esetében jelentősebb mértékű volt az expresszió emelkedése a fruktózos csoportban. A lipoproteinlipáz enzim feladata a zsírsavak felvételének segítése a szövetek számára lipoprotein partikulumokból (Kersten, 2014), míg a CD36 receptor fehérje a zsírok sejten belülré való transzportjában játszik fontos szerepet (Park, 2014). Mindkét fehérje hozzájárulhat a zsírok májszövetbe rakódásához és ezzel a zsírmáj kialakításához, ezért ezen eredmények alátámasztják a szövettani metszeteken látottakat,

miszerint a csak zsírdús étrend hatására megkezdődött a zsírok akkumulációja a májban, de a diéta fruktózzal való kiegészítésének hatására nagyobb mennyiségben.

	%			t-próba		
	kontroll	HFD	HFD F	k vs. HFD	k vs. HFD+F	HFD vs. HFD+F
Lpl	100	282	430	3E-07	4E-08	0.035
LdlR	100	93	81	0.523	0.061	0.115
Fgf21	100	35	83	0.001	0.401	0.003
ApoA5	100	70	65	4E-06	2E-06	0.274
Cd36	100	186	284	0.000	7E-08	0.000
Tnfa	100	116	123	0.590	0.520	0.870
Il1b	100	88	95	0.446	0.711	0.680
Irs-1	100	73	71	0.001	0.001	0.652
Leap	100	101	97	0.888	0.745	0.666
Esrra	100	85	81	0.059	0.013	0.569
LipC	100	86	72	0.107	0.001	0.057
InsR	100	89	75	0.011	4E-06	0.004
LepR	100	75	116	0.218	0.558	0.060
P62	100	67	71	3E-05	0.000	0.574
LC3	100	78	82	0.001	0.006	0.490
Hsp25	100	84	108	0.286	0.573	0.096
Chemerin	100	91	83	0.218	0.013	0.261
Visfatin	100	116	110	0.256	0.455	0.655
FNDC5	100	148	260	0.007	0.000	0.021
AdipoR1	100	82	79	0.003	4E-05	0.652
Leptin	100	127	154	0.639	0.370	0.681

5. ábra Májyszövet qPCR vizsgálata

Az májszövet relatív génexpressziós változásait qPCR módszerrel detektáltuk. A génexpresszió szint változását százalékban ábrázoltuk a kontroll állatokban mért értékhez viszonyítva. A génexpresszió növekedését lila szín, míg a csökkenését kék szín jelöli.

Az FGF21 expressziója csak a magas zsírtartalmú étrend hatására csökkent szignifikánsan a kontrollal szemben. Az ApoA5 apolipoprotein expressziója mindkét kezelt csoport esetén statisztikailag szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. A p62 expressziójának statisztikailag kimutatható csökkenése mutatkozott a kezelések hatására. Az FNDC5, az irisin miokin prekursora, esszenciális a metabolikus homeosztázis fenntartásához, diszregulációja metabolikus rendellenességek megjelenésével jár (Cao és mtsai., 2019). A génexpressziója jelentősen növekedett az elhízott állatokban, de a fruktózt is fogyasztó egerekben nagyobb mértékű volt. Ennek megfelelően ebben a csoportban több metabolikus rendellenesség jelent meg a másik elhízott csoporttal szemben.

Viszcerális fehér zsírszövet génexpressziós változásai

Elhízás során a fehér zsírszövet gyulladt fenotípusra vált, amely következtében gyulladásos citokinek és adipokinek termelésével alacsony szintű krónikus gyulladást idéz elő a szervezetben (Alberti és Zimmet, 1998). A viszcerális fehér zsírszövet állapotának felmérése érdekében megvizsgáltuk a génexpressziós mintázatát (6. ábra). A kontrollhoz képest szignifikáns mértékben megnőtt a TNF α és a TGF β expressziós szintje mindkét kezelt csoportban. A két elhízott csoportot összehasonlítva mindkét gyulladásos citokin szintje jelentős további növekedést mutatott a magas zsír- és fruktóz tartalmú kezelés hatására. Ezek alapján következtethetünk arra, hogy már zsírdús diéta hatására is kialakult gyulladás, de a fruktóz ezt tovább súlyosbítja. A szakirodalom szerint azért lehetséges, hogy egy alacsony szintű krónikus gyulladás alakul ki elhízás során, mert a gyulladásos citokinek szintjének emelkedésével egyetemben megemelkedik a gyulladást csökkentő citokinek szintje is (Fujisaka és mtsai., 2009). Ennek megfelelően az IL-10 kifejeződése is megemelkedett az egészséges állatokhoz képest az elhízott állatokban, és a két etetett csoport közül a fruktóz oldatot is fogyasztóknál volt magasabb a gyulladást csökkentő citokin génexpressziója. A leptin adipokin, amit főként a zsírszövet szekretál, az étvágy csökkentésében játszik fontos szerepet. Emellett csökkenti a zsírszövet inzulinérzékenységét, lipidek szintézisét és gátolja az akkumulációjukat is a zsírszövetbe (Jin és mtsai. 2000; Harris 2014; Peelman és mtsai. 2014; Forny-Germano és mtsai. 2019). A kifejeződése zsírdús diéta és a nyugati étrend alkalmazásának hatására is magasabb szintű volt, de a két kezelés hatása között nem volt szignifikáns különbség. Állandóan magas leptin szint esetén leptin-rezisztencia alakul ki, aminek hatására a sejtek érzéketlenné válnak a leptinnel szemben, ami már nem lesz képes kiváltani a hatását, ezért egyre több termelődik belőle (Frederich és mtsai., 1995). A chemerin is egy adipokin, ami a szakirodalom szerint növeli a táplálék bevitelt, segíti a zsírszövet növekedését, valamint gyulladást és angiogenezist indukál a zsírszövetben (Helfer és Wu, 2018). A leptinhez hasonlóan expressziós szintje megemelkedett mindkét etetett csoportban, azonban ez esetben sem volt megfigyelhető szignifikáns változás a zsírdús diéta fruktózzal való kiegészítésének alkalmazásával.

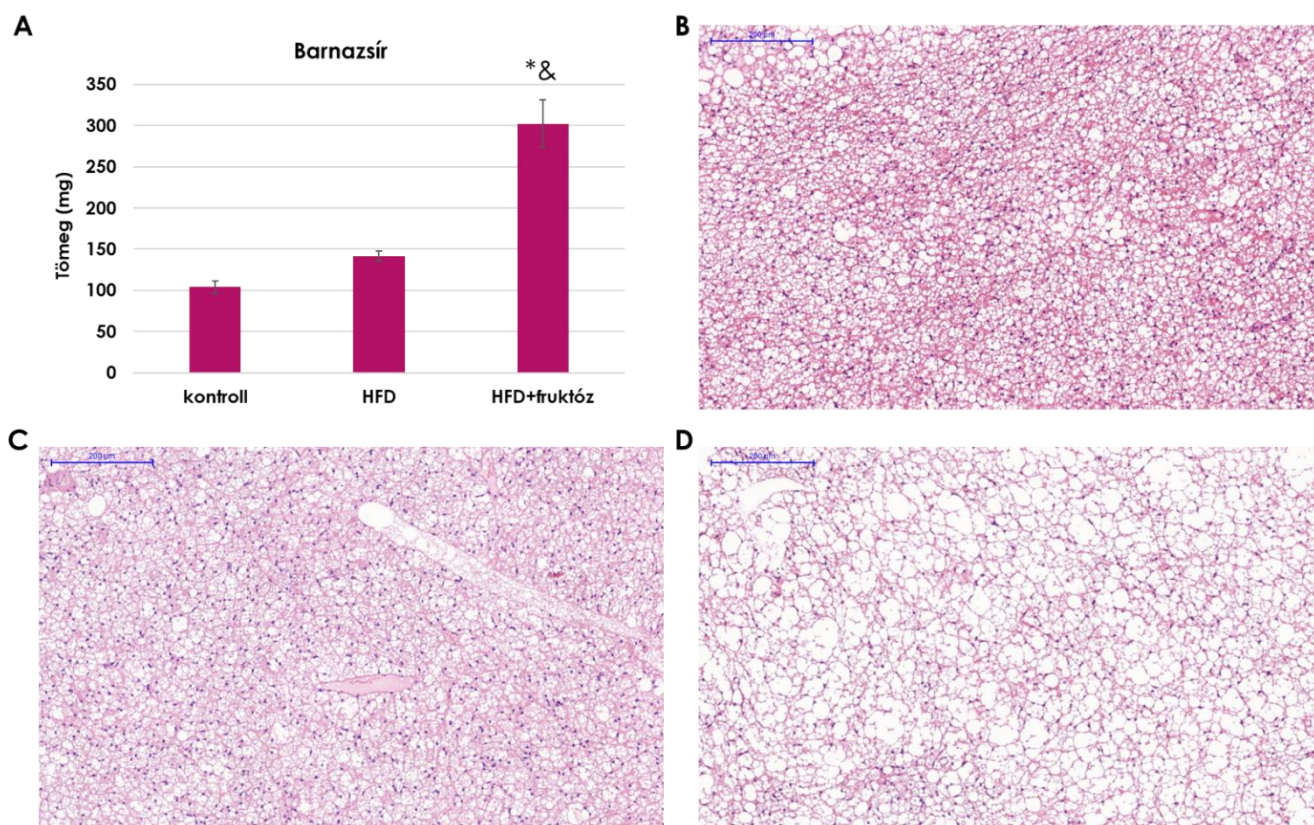
	%			t-próba		
	kontroll	HFD	HFD F	k vs. HFD	k vs. HFD+F	HFD vs. HFD+F
TNFA	100	184	353	0.001	0.000	0.004
Il1b	100	83	125	0.367	0.348	0.053
Il6	100	103	110	0.871	0.655	0.642
Il10	100	215	405	0.008	0.000	0.012
TGFb	100	169	239	0.000	0.000	0.002
leptin	100	340	409	0.001	0.000	0.198
chemerin	100	170	190	0.004	0.001	0.131
visfatin	100	94	108	0.594	0.520	0.041
Fgf21	100	59	94	0.467	0.701	0.515
LepR	100	83	96	0.090	0.685	0.184

6. ábra Viscerális fehér zsírszövet qPCR vizsgálata

A viscerális fehér zsírszövet relatív génexpressziós változásai qPCR módszerrel. A génexpresszió szint változását százalékban ábrázoltuk a kontroll állatokban mért értékhez viszonyítva. A génexpresszió növekedését lila szín, míg a csökkenését kék szín jelöli.

Barna zsírszövet vizsgálat eredményei

A fehér zsírral szemben a barna zsírszövet fő feladata nem az energiaraktározás, hanem a termogenezisben játszik fontos szerepet. Kevésbé fogékony arra, hogy lokális gyulladás alakuljon ki benne elhízás miatt, azonban súlyos esetben végül itt is kialakulhat gyulladásos környezet. Ez akadályozza a szövet energiafelhasználó mechanizmusát és a glükóz felvételét, ami a termogén aktivitás zavaraihoz vezet (Villarroya és mtsai., 2018). Ezért megvizsgáltuk az állatok interscapularis barna zsírszövetének állapotát. A szövet tömege csak zsírdús diéta alkalmazásának hatására nem mutatott szignifikáns változást a kontrollhoz képest (7. A ábra). Ezzel szemben a magas zsír- és fruktóz tartalmú étrenden nevelt állatok szervtömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll állatoké. A két elhízott csoportot összehasonlítva a fruktózzal kiegészített zsírdús étrend hatására volt szignifikánsan magasabb a barna zsírszövet tömeg gyarapodása. A tömegnövekedés arra is utalhat, hogy az eredendően nem energiatárolásra szolgáló barna zsírszövetben is megkezdődött a zsír akkumulációja. Ezt a szövettani metszetek képe is alátámasztja: míg a kontroll (7.B ábra) és zsírdús diétán tartott állatok (7. C ábra) barnazsírsejtjei sok apró lipidcseppet tartalmaznak, addig a fruktózt is fogyasztó állatok szövetében megjelennek az inkább fehérzsírra jellemző, nagyobb lipidcseppek is (7. D ábra).



7. ábra Barna zsírszövet vizsgálata

Egerek barnazsírszövetének tömege (A). A hematoxinil-eozin festett barnazsírszövet struktúrája. B - kontroll, C - HFD, D – HFD+F. Átlag $\pm$ SEM. Mércse: 200 μ m. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs.HFD; * Kontroll vs.HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: n=14; HFD: n=15; HFD+F: n=14

Feltételezhetően ez a szövet működését is befolyásolja, ezért az ebben szerepet játszó gének expressziós szintjét qPCR segítségével megvizsgáltuk (8. ábra). Érdekes, hogy az UCP1, a cidea és a cox8b termogenezis markerek (Garcia és mtsai., 2016) expressziós szintje ellentétesen változott a két kezelés hatására. A barna zsírszövet egyik fő feladata a lipidek oxidációjából nyert energiát felhasználni hőtermelésre szükség esetén (Sapa-Kishi és Ceddia, 2016). Mindhárom gén expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt fruktózzal kiegészített zsírdús étrend hatására a zsírdús tápon tartott csoporttal összevetve. Feltehetőleg ez hozzájárulhatott a szerv elzsírosodásához, ugyanis ezen gének termékeinek csökkent szintje miatt alacsonyabb szintű lehetett a termogén aktivitás, így felhalmozódhattak a zsírok a sejtekben.

	%			t-próba		
	kontroll	HFD	HFD F	k vs. HFD	k vs. HFD+F	HFD vs. HFD+F
Gapdh	100	118	131	0.227	0.069	0.299
Hsp25	100	110	114	0.518	0.333	0.751
LepR	100	67	47	0.037	0.000	0.072
Ab cryst	100	79	85	0.638	0.666	0.877
TGFb	100	97	102	0.736	0.839	0.520
UCP1	100	128	90	0.172	0.560	0.006
Cidea	100	105	83	0.482	0.053	0.006
Fgf21	100	144	227	0.126	0.003	0.020
TNFa	100	121	140	0.290	0.038	0.357
CD36	100	112	99	0.264	0.936	0.061
Hsp70	100	97	89	0.928	0.672	0.721
Il1b	100	99	97	0.969	0.878	0.889
Cox8b	100	111	76	0.117	0.005	0.000
chemerin	100	102	124	0.786	0.023	0.001
leptin	100	191	321	0.025	0.001	0.029
visfatin	100	102	66	0.879	0.001	0.000

8. ábra Barna zsírszövet qPCR vizsgálata

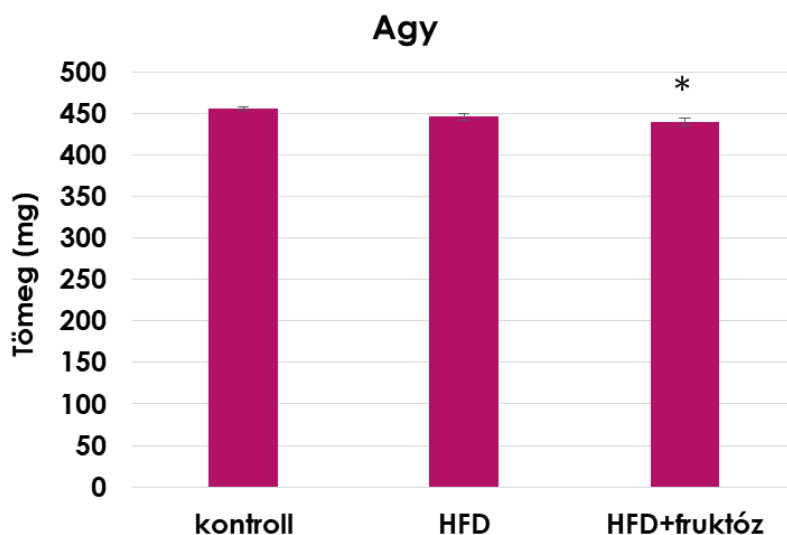
A barna zsírszövet relatív génexpressziós változásai qPCR módszerrel. A génexpresszió szint változását százalékban ábrázoltuk a kontroll állatokban mért értékhez viszonyítva. A génexpresszió növekedését lila szín, míg a csökkenését kék szín jelöli.

Az FGF21 expressziója a csak zsírdús tápon tartott egerekben nem változott statisztikailag szignifikánsan a kontrollal összevetve. Azonban a fruktózzal kiegészített zsírdús étrend alkalmazásával szignifikánsan nőtt az expressziós szintje a kontrollal és a másik kezelt csoporttal szemben is. Az FGF21 termelődését különböző stressz hatások indukálhatják, feladata a barna zsírszövetben a termogenezis aktiválása (Itoh, 2014). Ez az eredményünk ellentétesnek tűnik a termogenezis markerek esetén tapasztaltakkal. A TNF α gyulladásos citokin csak zsírdús étrend hatására nem mutatott szignifikáns génexpresszió növekedést a kontrollhoz képest, de az étrend fruktózzal való kiegészítése esetén már statisztikailag szignifikánsan emelkedett a kifejeződése. Ebből az látszik, hogy túlzott fruktóz bevitel hatására már kialakult gyulladás a szövetben. A chemerin expressziójának a mértéke is fokozódott a fruktózos csoportban a kontrollal és a másik kezelt csoporttal összehasonlítva. Ez az adipokin arról ismert, hogy lipidek akkumulációját idézi elő (Kwon és Pessin, 2013). A leptin kifejeződési szintje zsírdús diéta és ennek fruktózzal kiegészített változatának hatására is szignifikánsan megemelkedett. Ha összevetjük a két kezelés hatását látható, hogy a fruktóz alkalmazása szignifikánsan megemelte a leptin expresszióját. A leptin ugyancsak képes aktiválni a termogenezist (Cannon és Nedergaard, 2004), azonban látható, hogy receptorának expressziója jelentős csökkenést mutat mindkét módosított étrenden tartott csoportban. Ez oka

lehet annak, hogy hiába nőtt meg az adipokin expressziós szintje, nem képes kiváltani termogenezist, vagyis leptin rezisztencia alakult ki a szövetben.

Agyszövet vizsgálatának eredményei

Irodalmi adatok szerint az elhízás és a metabolikus szindróma tünetei az agy működésére is hatással lehetnek (Yates és mtsai., 2012; Arshad és mtsai., 2018). Ezért kíváncsiak voltunk, hogy történt-e változás a kísérletünkben használt diéták hatására az állatok agyában. Először megmértük a szerv tömegét, ahol arra lettünk figyelmesek, hogy magas zsír- és fruktóz tartalmú étrend hatására szignifikánsan csökkent az agy tömege az egerekben a kontroll csoporthoz képest (9. ábra). E jelenség okának felderítése érdekében megvizsgáltuk az állatok agyának génexpressziós mintázatát is qPCR segítségével (10. ábra).



9. ábra Agy tömeg változása a diéták hatására

Állatok agy tömege csoportonként. Átlag $\pm$ SEM. Szignifikancia: $p < 0,05$; # Kontroll vs.HFD; * Kontroll vs.HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: $n=14$; HFD: $n=15$; HFD+F: $n=14$

A kontrollhoz képest a magas zsírtartalmú étrend hatására nem alakult ki szignifikáns különbség egyik gén esetén sem. A diéta fruktózzal való kiegészítésének alkalmazásával az IBA1 és Trem2 mikroglia markerek egy alacsony szintű, de statisztikailag szignifikáns mértékű növekedést mutattak a kontrollal összevetve a csoportot. Továbbá a makrofág marker Mrc1 expressziós szintje is statisztikailag szignifikánsan növekedett ugyanebben a csoportban a kontrollal és a másik elhízott csoporttal összehasonlítva is. Ezek az adatok egy kismértékű gyulladásra engednek következtetni. A leptin receptor expressziója a magas zsír- és fruktóz

tartalmú étrenden nevelkedett egerekben nem csak a kontrollal, de a másik etetett csoporttal szemben is statisztikailag szignifikáns növekedést mutatott. Ez egy érdekes eredményünk, mert a fehér zsírszövet által termelt leptin nagy mennyiségének hatására rezisztencia alakulhat ki, ahogy ezt a barna zsírszövetnél is tapasztaltuk, emiatt pedig a receptor kifejeződésének csökkenését váránk. De a folyamat valószínűleg nem ennyire egyszerű, az okának felderítése további vizsgálatokat igényel.

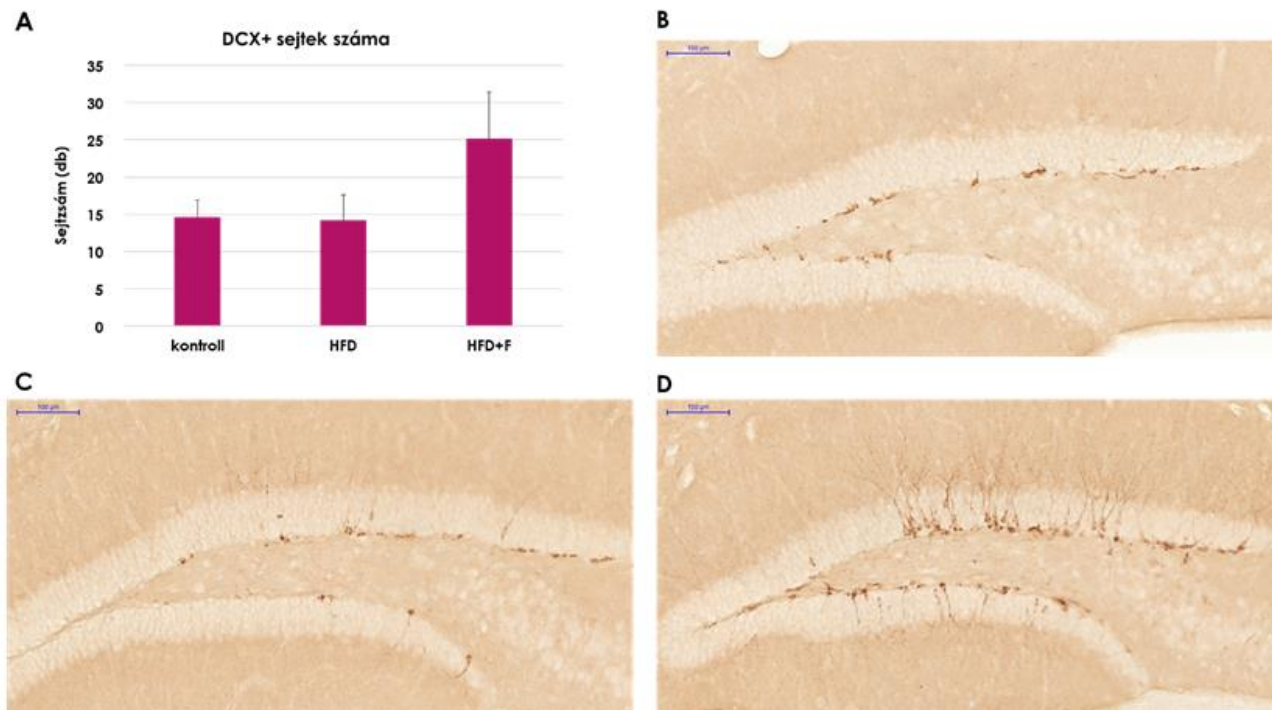
	%			t-próba		
	kontroll	HFD	HFD F	k vs. HFD	k vs. HFD+F	HFD vs. HFD+F
GFAP	100	99	104	0.865	0.664	0.608
Iba1	100	117	120	0.055	0.025	0.494
Trem2	100	108	115	0.228	0.043	0.288
InsR	100	99	102	0.593	0.703	0.350
LepR	100	102	115	0.799	0.006	0.009
Pgp	100	99	102	0.860	0.827	0.678
BDNF	100	89	91	0.084	0.202	0.799
Glut1	100	92	102	0.185	0.864	0.151
Cd68	100	100	104	0.947	0.348	0.324
Il6	100	90	113	0.379	0.256	0.034
Mrc1	100	106	122	0.422	0.007	0.025
Arg1	100	85	87	0.094	0.158	0.813
Il1b	100	103	104	0.844	0.768	0.950
TNFa	100	94	87	0.655	0.251	0.490

10. ábra Agyszövet qPCR vizsgálata

Az agyszövet relatív génexpressziós változásai qPCR módszerrel. A génexpresszió szint változását százalékban ábrázoltuk a kontroll állatokban mért értékhez viszonyítva. A génexpresszió növekedését lila szín, míg a csökkenését kék szín jelöli.

Végezetül az egerek agyából fagyasztott koronális metszeteket készítettünk, és doublecortin (DCX) festést végeztünk, ezzel láthatóvá tettük az újonnan születő neuronokat a hippocampus gyrus dentatus területén (11. ábra). A zsírdús diéta önmagában nem okozott jelentős változást. Magas zsír- és fruktóz tartalmú étrend esetén azt tapasztaltuk, hogy egyes állatokban drasztikus mértékben megnőtt a DCX pozitív sejtek száma (11. D ábra). Mivel nem volt minden állatban megfigyelhető ilyen nagymértékű növekedés, a nagy szórásnak köszönhetően a csoportra jellemző átlagok közötti különbség statisztikailag nem szignifikáns (11. A). Ennek ellenére nem hagyhatjuk figyelmen kívül a jelenséget. Irodalmi adatok szerint az agyat ért sérülések hatására, azok ellensúlyozása érdekében, aktiválódhat a neurogenesis

(Chiaretti és mtsai., 2008; Bregy és mtsai., 2012; Zhu Man és mtsai., 2018; Clark és mtsai., 2021). Azt feltételezzük, hogy a fruktózzal kiegészített diéta egyes állatok agyában súlyosabb elváltozásokat okozhat, ami a DCX+ sejtek számának növekedéséhez vezethet.



11. ábra Agy vizsgálata

Doublecortin pozitív sejtek száma csoportonként (A). Koronális agymetszeteken doublecortin festéssel láthatóvá vált újonnan születő neuronok a hippocampusz gyrus dentatusában. B - kontroll, C – HFD, D – HFD+F. Átlag $\pm$ SEM. Mércse 100 μ m. Szignifikancia: $p < 0,05$ # Kontroll vs. HFD; * Kontroll vs. HFD+; és HFD vs. HFD+F; Csoportonkénti egyedszám: Kontroll: n=14; HFD: n=15; HFD+F: n=14

Összefoglalás

A kísérletünk során arra voltunk kíváncsiak, hogy zsírdús diéta (HFD - *high fat diet*), illetve a nyugati étrendet jobban mintázó magas zsír- és fruktóz tartalmú diéta (HFD+F – *high fat and fructose diet*) hatására milyen gyulladásos folyamatok és metabolikus elváltozások alakulnak ki. Emellett megfigyeltük, hogy a két étrend alkalmazásának hatására kialakuló változások között vannak-e különbségek. Ezek érdekében hím C57BL6/J egerek egy csoportját zsírdús étrenden tartottuk, míg egy másik csoportjukat magas fruktóz tartalmú ivóvízzel kiegészített zsírdús diétán. Kontrollnak normál tápon nevelt C57BL6/J egereket használtunk. A kezelést 3 hónapos korukban kezdtük, majd 5 hónapon át tartott.

A kísérlet teljes időtartama alatt monitoroztuk az állatok testtömegét. A végére mindkét diéta hatására szignifikáns mértékű testtömeg gyarapodás volt megállapítható, de az elhízás fruktóz alkalmazásával jelentősebb mértékű volt. A kezelés kezdetétől számítva az 5. hónapban orális glükóz tolerancia teszttel felmértük az állatok szervezetének glükóz toleranciáját. Glükóz intolerancia csak a HFD+F csoportban alakult ki. Kolorimetriás tesztekkel megállapítottuk a szérum mintákból, hogy mindkét etetett csoport összkoleszterin, LDL- és HDL-koleszterin koncentrációja szignifikánsan megemelkedett a kontrollhoz képest, de a kezelt csoportok közt nem volt különbség. A szérum triglicerid koncentrációra nem volt hatással egyik étrend sem. Az állatok feldolgozása során megmértük az interscapuláris barna zsírszövet, a máj és az agy tömegét. A barna zsír és a máj tömege jelentősen megemelkedett a HFD+F csoportban a kontrollhoz és a HFD csoporthoz képest is, valamint ugyanennek a csoportnak a diéta csökkentette az agy tömegét. Ezek háttérében álló okok felderítése érdekében megfigyeltük az állatok ugyanezen szerveinek és a fehér zsírszövet génexpressziós változásait. A fehér zsírszövetben gyulladást és leptin rezisztenciát detektáltunk mindkét elhízott csoportban, de ezek a HFD+F csoportban sokkal súlyosabbak voltak. Ugyanebben a csoportban zsírmáj kialakulását igazoltuk hematoxin-eozin festett májmetszeteken, azonban ennek hatására gyulladás még nem volt kimutatható. Ehhez hasonlóan a HFD+F csoportnak a barna zsírszövetében is fehér zsírszövetre jellemző nagyobb lipidcseppek jelentek meg, és ebben a szövetben is leptin rezisztencia alakult ki. Ebben a csoportban csökkent az állatok agyának tömege, aminek ellensúlyozása érdekében neurogenesis aktiválódhatott, amit DCX festéssel tettünk láthatóvá. Az okok további tisztázása érdekében az alábbi festéseket tervezzük

elvégezni, illetve vannak folyamatban: asztrocita és mikroglia aktiváció vizsgálata GFAP és IBA1 immunfestéssel, makrofágok festése, elhalt sejtek festése Fluoro Jade festéssel.

Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az elhízás során fellépő gyulladásos folyamatok és metabolikus elváltozások az egész szervezetre kiterjednek, és a tüneteket súlyosbítja a nyugati étrendet modellező magas zsír, és fruktóz tartalmú táplálkozás. Kutatásunk hozzájárulhat a társadalmunkra jellemző életmód káros hatásai mögött álló sejtszintű és molekuláris mechanizmusok jobb megértéséhez, ami a későbbiekben elősegítheti az elhízás miatt kialakuló rendellenességek terápiás kezelését.

Köszönetnyilvánítás

Munkámat a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetében, a Molekuláris Stresszbiológiai csoportban végeztem. Szeretném megköszönni Török Zsoltnak, hogy megvalósíthattam ezt a dolgozatot a csoportjában. Hálás köszönettel tartozom Tóth E. Melindának témavezetéséért, segítsége nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Köszönöm az állandó figyelmét és irányítást a munkám során. Szeretném megköszönni Ruppert Zsófiának a kolorimetriás tesztek elvégzéséhez adott irányítást és az eredmények kiértékelését. Köszönöm Dukay Brigittának a DCX festést, valamint Hajdú Petrának a festés kiértékelése során a közreműködését. Köszönettel tartozom Kis-Sebestyén Lászlónak az állatok gondozásában nyújtott segítségéért. Szeretném megköszönni továbbá a csoport minden tagjának a segítségét a munkám során.

Köszönettel tartozom még Tiszlavicz Lászlónak és csoportjának (Patológia Intézet) a hematoxin-eozin festések elvégzéséért és kiértékelésükért.

Irodalomjegyzék

- Aeberli, I. (2008). The increase of fatty acid-binding protein aP2 in overweight and obese children: Interactions with dietary fat and impact on measures of subclinical inflammation. *International Journal of Obesity*, 32(10), 1513–1520. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.128>
- Aeberli, I., Molinari, L., Spinaz, G., Lehmann, R., L'Allemand, D., & Zimmermann, M. B. (2006). Dietary intakes of fat and antioxidant vitamins are predictors of subclinical inflammation in overweight Swiss children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 748–755. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.4.748>
- Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7), 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Alvarez, J. A., Higgins, P. B., Oster, R. A., Fernandez, J. R., Darnell, B. E., & Gower, B. A. (2009). Fasting and postprandial markers of inflammation in lean and overweight children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(4), 1138–1144. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.26926>
- Arshad, N., 'Ain, Lin, T. S., & Yahaya, M. F. (2018). Metabolic Syndrome and Its Effect on the Brain: Possible Mechanism. *CNS & neurological disorders drug targets*, 17(8), 595–603. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180724143258>
- Atkinson, F. S., Brand-Miller, J. C., Foster-Powell, K., Buyken, A. E., & Goletzke, J. (2021). International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, 114(5), 1625–1632. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab233>
- Bastard, J.-P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., & Hainque, B. (2000). Elevated Levels of Interleukin 6 Are Reduced in Serum and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women after Weight Loss*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(9), 3338–3342. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6839>
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. In *Trends in Cell Biology* (Köt. 11, Szám 9, o. 372–377). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
- Bellingan, G. J., Xu, P., Cooksley, H., Cauldwell, H., Shock, A., Bottoms, S., Haslett, C., Eugene, S., Geoffrey, M., & Laurent, J. (2002). Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 196(11), 1515–1521. <https://doi.org/10.1084/jem.20011794>
- Berrone, E., Beltramo, E., Solimine, C., Ape, A. U., & Porta, M. (2006). Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9307–9313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600418200>
- Bhatt, A., & Rohatgi, A. (2016). HDL Cholesterol Efflux Capacity: Cardiovascular Risk Factor and Potential Therapeutic Target. *Current Atherosclerosis Reports*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11883-015-0554-1>
- Bhupathiraju, S. N., Tobias, D. K., Malik, V. S., Pan, A., Hruby, A., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2014). Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes: results from 3 large US cohorts and an updated meta-analysis 1-3. *Am J Clin Nutr*, 100, 218–250.

- <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.079533>
- Blackburn, P., Després, J. P., Lamarche, B., Tremblay, A., Bergeron, J., Lemieux, I., & Couillard, C. (2006). Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men. *Obesity*, 14(10), 1747–1754. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.201>
- Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity. *Am J Clin Nutr*, 68(6), 1157–1173. <https://doi.org/10.1093/ajcn/68.6.1157>
- Bregy, A., Nixon, R., Lotocki, G., Alonso, O. F., Atkins, C. M., Tsoulfas, P., Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2012). Posttraumatic hypothermia increases doublecortin expressing neurons in the dentate gyrus after traumatic brain injury in the rat. *Experimental Neurology*, 233(2), 821–828. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.008>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0010402890022.JPEG>
- Cao, R. Y., Zheng, H., Redfearn, D., & Yang, J. (2019). FNDC5: A novel player in metabolism and metabolic syndrome. *Biochimie*, 158, 111–116. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2019.01.001>
- Chiaretti, A., Antonelli, A., Genovese, O., Pezzotti, P., Rocco, C. Di, Viola, L., & Riccardi, R. (2008). Nerve growth factor and doublecortin expression correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care*, 65(1), 80–85. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31805f7036>
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*, 51(5), 794–811. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020>
- Clark, L. R., Yun, S., Acquah, N. K., Kumar, P. L., Metheny, H. E., Paixao, R. C. C., Cohen, A. S., & Eisch, A. J. (2021). Mild Traumatic Brain Injury Induces Transient, Sequential Increases in Proliferation, Neuroblasts/Immature Neurons, and Cell Survival: A Time Course Study in the Male Mouse Dentate Gyrus. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1372. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.612749>
- DeBose-Boyd, R. A. (2018). Significance and regulation of lipid metabolism. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 81, 97. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.12.003>
- DeFronzo, R. A., & Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14(3), 173–194. <https://doi.org/10.2337/diacare.14.3.173>
- Douard, V., & Ferraris, R. P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(2). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90245.2008>
- Douard, V., & Ferraris, R. P. (2013). The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *Journal of Physiology*, 591(2), 401–414. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.215731>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247089>
- Forny-Germano, L., De Felice, F. G., & Do Nascimento Vieira, M. N. (2019). The role of leptin and adiponectin in obesity-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JAN), 1027. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01027>
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to

- leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311–1314. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>
- French, S., & Robinson, T. (2003). Fats and food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6(6), 629–634. <https://doi.org/10.1097/00075197-200311000-00004>
- Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M., & Tobe, K. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58(11), 2574–2582. <https://doi.org/10.2337/db08-1475>
- Gago, G., Diacovich, L., & Gramajo, H. (2018). Lipid metabolism and its implication in mycobacteria-host interaction. *Current opinion in microbiology*, 41, 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2017.11.020>
- Garcia, R. A., Roemmich, J. N., & Claycombe, K. J. (2016). Evaluation of markers of beige adipocytes in white adipose tissue of the mouse. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/S12986-016-0081-2>
- Gibbons, G. F., Islam, K., & Pease, R. J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(1), 37–57. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00182-1)
- Glass, C. K. and J. L. W. (2006). Atherosclerosis: The Road Ahead Review. *Cytokine Gene Polymorphisms in Multifactorial Conditions*, 104, 363–378.
- Harris, R. B. S. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.009>
- Hassanali, Z., Ametaj, B. N., Field, C. J., Proctor, S. D., & Vine, D. F. (2010). Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR:LA-cp rat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(2), 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01130.x>
- Helfer, G., & Wu, Q. F. (2018). Chemerin: A multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *Journal of Endocrinology*, 238(2), R79–R94. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0174>
- Hill, J. O., Melanson, E. L., & Wyatt, H. T. (2000). Dietary fat intake and regulation of energy balance: Implications for obesity. *Journal of Nutrition*, 130(2 SUPPL.), 284S–288S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.284s>
- Hosseini, Z., Whiting, S. J., & Vatanparast, H. (2016). Current evidence on the association of the metabolic syndrome and dietary patterns in a global perspective. *Nutrition Research Reviews*, 29(2), 152–162. <https://doi.org/10.1017/S095442241600007X>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006 444:7121, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 109(1), 41–50. <https://doi.org/10.1172/jci11638>
- Itoh, N. (2014). FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 5(JUL), 107. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00107/BIBTEX>
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., & Rabinowitz, J. D. (2018). The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metabolism*, 27(2), 351–361.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>
- Jéquier, E. (2002). Pathways to obesity. *International Journal of Obesity*, 26, S12–S17. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802123>
- Jin, L., Zhang, S., Burguera, B. G., Couce, M. E., Osamura, R. Y., Kulig, E., & Lloyd, R. V.

- (2000). Leptin and Leptin Receptor Expression in Rat and Mouse Pituitary Cells1. *Endocrinology*, 141(1), 333–339. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7260>
- Johnson, R. J., Perez-Pozo, S. E., Sautin, Y. Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L. G., Feig, D. I., Shafiu, M., Segal, M., Glasscock, R. J., Shimada, M., Roncal, C., & Nakagawa, T. (2009). Hypothesis: Could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocrine Reviews*, 30(1), 96–116. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0033>
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>
- Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(7), 919–933. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.03.013>
- Kopp, H. P., Krzyzanowska, K., Möhlig, M., Spranger, J., Pfeiffer, A. F. H., & Schernthaner, G. (2005). Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women. *International Journal of Obesity*, 29(7), 766–771. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802983>
- Krause, N., & Wegner, A. (2020). Fructose Metabolism in Cancer. *Cells*, 9(12), 2635. <https://doi.org/10.3390/cells9122635>
- Kwon, H., & Pessin, J. E. (2013). Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4(JUN). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2013.00071/FULL>
- Lanaspa, M. A., Ishimoto, T., Cicerchi, C., Tamura, Y., Roncal-Jimenez, C. A., Chen, W., Tanabe, K., Andres-Hernando, A., Orlicky, D. J., Finol, E., Inaba, S., Li, N., Rivard, C. J., Kosugi, T., Sanchez-Lozada, L. G., Petrash, J. M., Sautin, Y. Y., Ejaz, A. A., Kitagawa, W., ... Johnson, R. J. (2014). Endogenous fructose production and fructokinase activation mediate renal injury in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(11), 2526–2538. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080901/-DCSUPPLEMENTAL>
- Lawrence, T., & Gilroy, D. W. (2007). Chronic inflammation: A failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, 88(2), 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00507.x>
- Liao, Q., Zhou, Y., Xia, L., & Cao, D. (2021). Lipid Metabolism and Immune Checkpoints. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1316, 191–211. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6785-2_12
- Lopez-Garcia, E., Schulze, M. B., Fung, T. T., Meigs, J. B., Rifai, N., Manson, J. A. E., & Hu, F. B. (2004). Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American journal of clinical nutrition*, 80(4), 1029–1035. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.4.1029>
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. (2007). Facilitated hexose transporters: New perspectives on form and function. *Physiology*, 22(4), 234–240. <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2007>
- Marshall, R. O., & Kooi, E. R. (1957). Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science*, 125(3249), 648–649. <https://doi.org/10.1126/science.125.3249.648>
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/289645>
- Nijhuis, J., Rensen, S. S., Slaats, Y., Van Dielen, F. M. H., Buurman, W. A., & Greve, J. W. M. (2009). Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. *Obesity*, 17(11), 2014–2018. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.113>
- Nordestgaard, B. G., Chapman, M. J., Ray, K., Borén, J., Andreotti, F., Watts, G. F., Ginsberg, H., Amarengo, P., Catapano, A., Descamps, O. S., Fisher, E., Kovanen, P. T., Kuivenhoven, J. A., Lesnik, P., Masana, L., Reiner, Z., Taskinen, M. R., Tokgözoğlu, L., & Tybjærg-Hansen, A. (2010). Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: Current

- status. *European Heart Journal*, 31(23), 2844–2853. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq386>
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(6), e99. <https://doi.org/10.1038/EMM.2014.38>
- Peelman, F., Zabeau, L., Moharana, K., Savvides, S. N., & Tavernier, J. (2014). Insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *Journal of Endocrinology*, 223(1), T9–T23. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0264>
- Phillips, M. C. (2014). Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24020–24029. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583658>
- Powell, E. E., Wong, V. W. S., & Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet*, 397(10290), 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
- Qatanani, M., & Lazar, M. A. (2007). Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes and Development*, 21(12), 1443–1455. <https://doi.org/10.1101/gad.1550907>
- Raetz, C. R. H. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 59(1), 129–170. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001021>
- Rattarasarn, C., Leelawattana, R., Soonthornpun, S., Setasuban, W., Thamprasit, A., Lim, A., Chayanunnukul, W., Thamkumpee, N., & Daendumrongsub, T. (2003). Regional abdominal fat distribution in lean and obese Thai type 2 diabetic women: Relationships with insulin sensitivity and cardiovascular risk factors. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 52(11), 1444–1447. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00257-9)
- Remmerie, A., & Scott, C. L. (2018). Macrophages and lipid metabolism. *Cellular immunology*, 330, 27–42. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2018.01.020>
- Sepa-Kishi, D. M., & Ceddia, R. B. (2016). Exercise-Mediated Effects on White and Brown Adipose Tissue Plasticity and Metabolism. *Exercise and sport sciences reviews*, 44(1), 37–44. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000068>
- Soares, R., & Costa, C. (2009). Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome. *Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in the Metabolic Syndrome*, 1–209. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9701-0/COVER>
- Spagnuolo, M. S., Iossa, S., & Cigliano, L. (2021). Sweet but bitter: Focus on fructose impact on brain function in rodent models. *Nutrients*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu13010001>
- Stefan, N., Kantartzis, K., Machann, J., Schick, F., Thamer, C., Rittig, K., Balletshofer, B., Machicao, F., Fritsche, A., & Häring, H. U. (2009). Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 64(1), 30–31. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000340775.89112.ae>
- Tappy, L., & Rosset, R. (2019). Health outcomes of a high fructose intake: the importance of physical activity. *Journal of Physiology*, 597(14), 3561–3571. <https://doi.org/10.1113/JP278246>
- Thorens, B., & Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 298(2). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>
- Varma, V., Boros, L. G., Nolen, G. T., Chang, C. W., Wabitsch, M., Beger, R. D., & Kaput, J. (2015). Fructose alters intermediary metabolism of glucose in human adipocytes and diverts glucose to serine oxidation in the one-carbon cycle energy producing pathway. *Metabolites*, 5(2), 364–385. <https://doi.org/10.3390/metabo5020364>
- Villarroya, F., Cereijo, R., Gavalda-Navarro, A., Villarroya, J., & Giralt, M. (2018). Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of internal medicine*, 284(5), 492–504. <https://doi.org/10.1111/JOIM.12803>
- White, J. S. (2008). Straight talk about high-fructose corn syrup: What it is and what it ain't.

- American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6). <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825B>
- WHO. (2022, szeptember 16). *Non-communicable diseases*. World Health. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-5101-2.00062-5>
- Wildman, R. P. (2009). Healthy obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(4), 438–443. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32832c6db7>
- Wildman, R. P., Muntner, P., Reynolds, K., McGinn, A. P., Rajpathak, S., Wylie-Rosett, J., & Sowers, M. R. (2008). The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: Prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Archives of Internal Medicine*, 168(15), 1617–1624. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.15.1617>
- Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S., & Herz, J. (1994). Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*, 264(5164), 1471–1474. <https://doi.org/10.1126/science.7515194>
- Yates, K. F., Sweat, V., Yau, P. L., Turchiano, M. M., & Convit, A. (2012). Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: A selected review of the literature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2060–2067. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.252759>
- Zhang, D. M., Jiao, R. Q., & Kong, L. D. (2017). High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients* 2017, Vol. 9, Page 335, 9(4), 335. <https://doi.org/10.3390/NU9040335>
- Zhu Man, L., Zhao, R. J., Zhi, X. S., Huang, Y., Chen, J. Y., Song, N. N., Su, C. J., & Ding, Y. Q. (2018). Expression of DCX and transcription factor profiling in photothrombosis-induced focal ischemia in mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 455. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00455>