

AZ OTKA ÁLTAL TÁMOGATOTT 101557 AZONOSÍTÓ SZÁMÚ

"A LIPID KÖRNYEZET HATÁSA A DERMÁLIS MAKROFÁGOK AKTIVÁCIÓJÁRA KÜLÖNBÖZŐ BŐRBETEGSÉGEKBEN"

CÍMŰ PD PÁLYÁZAT SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉSE

1. Zsír felhalmozódással járó makrofágok karakterizálása bőr léziókban

A makrofágok zsírfelvétele számos (bőr)betegségben megfigyelhető, ugyanakkor jelenlétük és azonosításuk hagyományos szövettani módszerekkel nem vagy csak korlátozottan lehetséges. Munkánk során, megbízható marker fehérjéket keresve, melyekkel egyértelműen azonosíthatjuk az aktív zsírfelvételt/zsíryanycserét folytató makrofágokat, a Pályázat megvalósítása során sikerült azonosítani a carboxypeptidase-M (CPM)-et. A verifikálás *in vitro* kísérleteiben, melyekben perifériás vérből szeparált monocitákat differenciáltattunk különböző makrofág polarizáló és aktiváló stimulusok és különböző zsírok jelenlétében, a CPM jelentős indukciót mutatott, igazolva, hogy mind mRNS mind pedig fehérje szintű kifejeződésében számos zsír szelektíven, közvetlenül játszik szerepet. További *in vivo* relevanciát keresve a CPM jelenlétére szövettani vizsgálatokat végeztünk, mely során megállapítottuk, hogy a CPM jelentős kifejeződést mutatott a sárga, sárgásbarna papulák és plakkok formájában elsősorban a szemhéjon megjelenő bőrxanthómákat alkotó zsírban gazdag makrofágokban, csakúgy mint az egyéb kórképekben megjelenő habos sejtekben egyaránt, mint az erek meszes plakkjaiban vagy a habos sejtekben gazdag lipid pneumonia, de olyan tumor asszociált makrofágokban is kifejeződött, melyek jelentős szöveti elhalással és így lokálisan felszabaduló zsírokkal jellemezhető malignus kórképekhez társultak.

Szövettani és kísérletes munkánk alapján kijelenthetjük, hogy nem csak a xanthómák esetében használható sikeresen a CPM, de egyéb zsírfelhalmozódást mutató makrofág akkumulációval járó kórképekben is, felvetve a CPM széles körű diagnosztikai alkalmazásának lehetőségét (1).

2. A FXIII-A detektálásának diagnosztikai alkalmazása bőrgyógyászati kórképekben

Munkánk folytatásaként, további részletekre kiterjedően kívántuk karakterizálni a zsírfelhalmozódást mutató sejteket a Langrehansejtspecifikus CD1a, dendritikus sejtekre jellemző CD11c, monocita/marofágra jellemző CD14, döntően makrofágra specifikus CD68, a jelenleg legelfogadottabb makrofág marker CD163, a makrofágok egy csoportján és a dendritikus sejteken egyaránt megjelenő mannose receptor (CD206) és DC-SIGN (CD209), valamint a makrofágok polarizációját jelző véralvadás XIII-as faktorának a alegységét (FXIII-A) jelölő markerreakciókkal xanthelasma, valamint további makrofág akkumulációval járó bőrbetegségek szövettani mintáiban.

A FXIII-A-ról korábbi munkánk során bemutattuk, hogy az alternatívan aktivált makrofágok markerének tekinthető, azaz olyan makrofágokban fejeződik csak ki, melyek nem a klasszikus értelemben vett kórokozókkal szemben aktiválódtak mint például a tuberkulózis, hanem a szöveti környezet átrendeződésének hatására, mely jellemző a sebgyógyulásra, számos nem infektív eredetű reaktív bőrgyógyászati kórképre vagy a tumorszövet átépülésére. Munkánk során a bemutatott markerek kombinációját alkalmazva verifikáltuk az előkísérletekben azonosított habos sejtek fenotípusát (CD163+/CD11c+/FXIII-A-) a xanthelazmákban, és hasonlítottuk össze olyan bőrbetegségekben levő makrofágokéval, melyek a xanthelasmához hasonlóan sem malignitás sem pedig infektív eredethez nem kapcsolódó granulomatosus bőrbetegségek kialakításában vesznek részt. Ennek megfelelően granuloma annulare (GA) és necrobiosis lipoidica (NL) szövettani mintákon is elvégeztünk immunhisztokémiai vizsgálatainkat, melyeket jelentős szöveti átépülés jellemez kifejezett zsíryanycsere érintettség nélkül (a NL neve ellenére). Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a GA és NL betegségekben a makrofágokat FXIII-A pozitivitás jellemzi (CD163+/FXIII-A+) szemben a xanthelasma FXIII-A negatív (CD163+/FXIII-A-) makrofágjaival, utalva arra hogy ez az utóbbi fenotípus a fokozott zsíryanycserével hozható összefüggésbe. További jelentős különbség, hogy GA és NL esetében a CD163+ és CD11c+ sejtek teljesen elkülönülő populációkat alkottak: míg a szövet nekrotikus részeiben kizárólagosan a CD11c+ sejtek

halmozódnak fel, addig a CD163+ sejtek körük csoportosulva figyelhetőek meg illetve a szövet egyéb struktúráit infiltrálva. CD11c pozitivitás a FXIII-A-val a GA és NL mintákban kizárólag a perivaszkulárisan elhelyezkedő néhány sejten volt megfigyelhető kolokalizációban, mely sejtípust a kézirat bírálójának javaslatára egy külön kézírathoz karakterizáljuk tovább.

Ezen publikációban mutattuk be, a FXIII-A és az alternatív makrofág aktivációt jelző egyéb markerfehérjék, mint a CD206 és CD209 együttes kimutatásával azt is, hogy a döntően szöveti átépüléssel járó granulomatózus bőrbetegségekben mint a GA és az NL, a CD163+ sejtek egyszerre pozitívak a FXIII-A-ra és a CD206 valamint CD209-re, azaz valóban az alternatív aktiváltság jellemzi az ezen kórképekben felhalmozódó makrofágokat. A publikáció a dermatohisztopatológia területén hiánypótlónak tekinthető, hiszen a FXIII-A-t számos bőrbetegségben használják makrofág és számos esetben helytelenül, ahogy erre ezen cikkel is felhívtuk a figyelmet, a dendritikus sejtek diagnosztikai eszközeként, anélkül, hogy kifejeződésének okát, illetve annak funkcionális jelentőségét ismernék. Eddigi munkánk alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a FXIII-A expressziója nem betegség specifikus, hanem az alternatívan aktiválódott makrofágok markere, mely koexpressziója egyéb makrofág markerekkel a szöveti környezet sajátosságaival, mint amilyen a zsírok jelenléte/hiánya vagy a szöveti átrendeződés, mutat összefüggést. A közlemény anyaga ugyanakkor nem csak a makrofágok és dendritikus sejtek immunhisztomémiai elkülönítéséhez ad biztos iránymutatást, hanem a vizsgált betegségek patogenezisére vonatkozóan is jelentős, új információkat szolgáltat. Ezen közlemény alapján felvetődik továbbá annak szükségessége is, hogy a GA és NL-t, mint a „tankönyvi” példáit a makrofágok akkumulációval járó bőrbetegségeknek, a dendritikus sejtek irányából is megközelítsük, új patológiai és esetleges terápiás célpontokat keresve **(2)**. A közlemény elismerő nemzetközi fogadtatását jelzi hogy számos felkérést kaptunk előadás tartására, mint a Keystone symposia keretei között megrendezésre kerülő „Granulomas in Infectious and Non-Infectious Diseases” vagy a négyévente megrendezésre kerülő „World Congress of Dermatology - Granulomatous Disorders (non-infectious) – From Sarcoidosis to IGD” szekció” konferenciákon.

3. A lipidek hatásának karakterizálása a dermalis makrofágok aktiválásában

Felismerve a xanthelasmákat alkotó makrofágoknak a bőrgyógyászati kórképekben jelen ismereteink szerint ezidáig egyedülálló fenotípusát, vizsgálatainkat génszinten is kiterjesztettük. Kísérleteinkkel arra kerestük a választ, hogy a sejtek mind morfológiai mind pedig funkcionális sajátosságait meghatározó fehérjéket kódoló messenger RNS (mRNS)-ek mintázatában milyen jellegzetes eltérések azonosíthatóak a xanthelasmás mintákban. A kapott génexpressziós profilt a granuloma annularében, illetve a meszes érplakkokban található makrofág populációkéval hasonlítottuk össze. A granuloma annularét a már fentebb ismertett jellegzetességei miatt, míg a meszes érplakkot a szintén jelentős zsírmakrofág felhalmozódás miatt választottuk. Az mRNS expresszió jellegének és mértékének összehasonló jellemzésével, a közlés előtt álló munkákban, jelentősen bővítettük tudásunkat a xanthelasmákat alkotó makrofágokban aktív zsírsanyagcserét szabályozó, mint például a sejtszintű zsírsanyagcserét a gyulladással génexpresszió szintjén összehangoló PPAR és LXR magreceptorok által mediált útvonalakra vonatkozóan, valamint érdekes hasonlóságokat és ugyanakkor eltéréseket tudtunk azonosítani a különböző makrofág populációkban (4).

4. Szöveti és genetikai eredményeink klinikai felhasználása

A genetikai mintázat megismerése tette lehetővé, a várhatóan néhány hónapon belül befejeződő, egyéb pályázati forrást is felhasználó (TÁMOP) további munkánkat is, melyben a xanthelasmákra jellegzetes eltérést mutató mRNS-eket kódoló gének egyedi nukleotid-polimorfizmusát (SNP) vizsgáltuk a Pályázat futamideje alatt összegyűjtött közel 100 xanthelasmás betegünkben. A vizsgálat létjogosultságát igazolja a beteganyagunk klinikai karakterizálása, mely bár alátámasztja, hogy a klinikai tünetekkel és laboratóriumi eltérésekkel jellemezhető zsírsanyagcsere eltérések kapcsolatban lehetnek a szemhéji xanthelasmák megjelenésével, ugyanakkor nem erősítik meg ennek jelenleg is széles körben dogmaként való elfogadását, azaz hogy a xanthelasmával rendelkező beteg

biztosan zsíryanycsere betegségben szenved: beteganyagunkban a betegek 20%-a normál testsúlyú volt, hyperlipidémia is mindössze a 30%-ukban volt mérhető, míg 60% feletti előfordulást csupán az LDL szintekben találtunk, melyhez eltérés SNP szinten az LDL-receptorban a betegek kevesebb mint 20%-ában volt csak igazolható. Eredményeink kéziratba rendezése folyamatban van (4).

5. Vizsgálatok kiterjesztése a faggyúsejtek, mint a bőr potenciális lipidforrásai, és a makrofágok kapcsolatának megismerésére

A faggyúsejtek mind biológiai mind pedig a bőrgyógyászati kutatás szempontjából talán legérdekesebb tulajdonsága hogy egyszerre képesek megváltoztatni az általuk termelt zsírok mennyiségét és jellegét, valamint gyulladásos fehérjéket is termelni. Ez a tulajdonságuk kap szerepet az akne pathogenezisét magyarázó elméletekben is, ahol a faggyúsejtek gyulladása további, a gyulladást felerősítő citokinek termelődését eredményezi, miközben megváltozik zsírtermelő képességük, megemelve a termelt faggyú mennyiségét és annak összetételét.

Az akne kialakulásában a makrofágok is központi szereppel bírnak mind a kórokozókkal szembeni védelemben, mind pedig a hegeképződéshez vezető szöveti károsodásban. A makrofágok ezen kettős, egymással látszólag ellentétes szerepét, korábban bemutattuk a klasszikus (patogénekkal szembeni válasz) és az alternatív (szöveti reorganizáció) aktiváción keresztül, külön ismertette a FXIII-A szerepét és annak diagnosztikus alkalmazását e két makrofágpopuláció elkülönítésében. A FXIII-A-ra épülő szövettani elemzéseinket kiterjesztetve aknés minták immunhisztokémiai vizsgálatára (CD163, CD206, CD209, FXIII-A) bemutattuk, hogy míg a faggyúmirigyek környezetében elhelyezkedő makrofágok alternatív (CD163+/CD206+/CD209+/FXIII-A+), addig a folliculus gyulladt struktúráját infiltráló makrofágok klasszikus aktiválódást mutattak (CD163+/FXIII-A-). Ezen megfigyelés alapján jogosan vetődött fel a kérdés, hogy a faggyúmirigyek, összhangban az előbbi pontban bemutatott gyulladás szabályozó hatásukkal, befolyásolhatják-e a dermalis makrofágok viselkedését is.

A faggyúsejtek körüli makrofág akkumulációban, *in vitro* kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy maguk a faggyúsejtek is szereppel bírhatnak, és képesek az aktivációs

stimulusok hatását befolyásolni. Míg az általuk termelt fehérjék, mint az CXCL-8 és IL-6 elsősorban a makrofágok „vonzásában” és aktiválásában játszhatnak szerepet addig a zsírok a makrofágok alternatív polarizációjához vezethetnek. Ezen közlés előtt álló eredmények alapján arra kerestük a választ, hogy a faggyúsejtek fehérje és lipid profilja milyen stimulusokkal befolyásolhatóak, melyen keresztül hatással lehetnek a környezetükben felhalmozódó makrofágokra is. Érdeklődésünk középpontjába így klinikopatológiai is releváns stimulusokat kerültek, mint a leptin mely kapocsként szolgálhat a nutritív tényezők és az akne kialakulása között. Kísérleteink során az SZ95 faggyúsejtvonalon elvégzett lipidanalízissel bemutattuk, hogy a leptin hatására, nem csak a faggyúsejtekben tapasztaltunk morfológiailag is azonosítható változásokat a zsírcseppek méretén keresztül, de jelentősen megemelkedett a faggyúsejtek telítetlen zsírsav termelése is, miközben a telített zsírsavak aránya jelentősen lecsökkent, épp úgy ahogy az az aknés betegek faggyújában is megfigyelhető. A leptin ugyanakkor számos sejttípusban képes gyulladást kiváltani az STAT3 és az NF- κ B útvonalakon keresztül, melyeket a faggyúsejtekben is aktívnak találtunk leptin kezelés hatására. Az IL-6 és a CXCL-8, továbbá a gyulladás közvetítésében szereplő enzimek is mint a COX2 és az 5-LOX indukálódott leptin kezelés hatására (3).

Ezen eredményeink alapján indultak el további vizsgálataink melyben a leptin hatására megváltozott lipid profil és az emelkedett szintű gyulladással fehérjék hatását kívánjuk vizsgálni a makrofágokra és egyéb immunsejtekre. Bízva a munka további pályázati támogatásában a faggyúsejteket mint immunkompetens sejteket kívánjuk bemutatni, melyek sejtszinten összekapcsolva a gyulladást a zsírsavanyagcserével, képesek befolyásolni a dermalis makrofágok jelenlétét és funkcióját nem csak aknéban de egyéb gyulladással bőrbetegségekben is.

OTKA támogatással megjelent és közlésre előkészített cikkek:

1. Tsakiris I, **Töröcsik D**, Gyongyosi A, Dozsa A, Szatmari I, Szanto A, Soos G, Nemes Z, Igali L, Marton I, Takats Z, Nagy L, Dezso B: **Carboxypeptidase-M is regulated by lipids and CSFs in macrophages and dendritic cells and expressed selectively in tissue granulomas and foam cells.**, Laboratory Investigation, 2012

IF: 3.961

2. **Töröcsik D**, Bárdos H, Hatalyák Z, Dezső B, Losonczy G, Paragh L, Péter Z, Balázs M, Remenyik E, Adány R: **Detection of factor XIII-A is a valuable tool for distinguishing dendritic cells and tissue macrophages in granuloma annulare and necrobiosis lipoidica.**, J Eur Acad Dermatol Venereol., 2013

IF: 3.105

3. **Töröcsik D**, Kovács D, Camera E, Lovászi M, Cseri K, Nagy GG, Molinaro R, Rühl R, Tax G, Szabó K, Picardo M, Kemény L, Zouboulis CC, Remenyik É: **Leptin promotes a proinflammatory lipid profile and induces inflammatory pathways in human SZ95 sebocytes.**, Br J Dermatology, 2014

IF: 4.100

4. *Paragh L, Fiatal S, Harangi M, Poliska S, Nagy P, Bardos H, Nagy GG, Losonczy G, **Töröcsik D**: Histological, genetic and clinical analysis of xanthelasma palpebrarum – közlésre előkészítve*

OTKA támogatással létrejött konferencia előadások (és absztraktok):

- **International Investigative Dermatology konferencia, Edinburgh, Skócia** (2013. május)
 - Detection of Factor XIII subunit A distinguishes dendritic cells and tissue macrophages in non-infectious granulomatous skin lesions
 - Leptin alters lipid metabolism and inflammation in SZ95 sebocytes
- **Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése, Budapest** (2013. december)
 - A faggyúsejtek befolyásolják a makrofágok aktivációját
- **Society for Investigative Dermatology konferencia, Albuquerque, USA** (2014. május)
 - Histological analysis of acne samples reveals different macrophage populations within the pilosebaceous unit
- **Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése, Budapest** (2014. november)
 - Granulomatous betegségek differenciáldiagnosztikája
 - A faggyúsejtek immunmoduláló hatásának karakterizálása - zsírok, fehérjék, sejtek
 - A xanthelasma “biopsziája” 2014 módszereivel
- **Keystone symposia, Santa Fe, USA** (2015. január)
 - Immunohistochemical characterization of FXIII-A+ cells in non-infectious granulomatous skin lesions
- **World Congress of Dermatology konferencia, Vancouver, Kanada** (2015. június)
 - Clinical, Histological and Genetic Dissection of Xanthelasma Palpebrarum
 - Granuloma annulare and necrobiosis lipoidica