

**Az elhízás és a testmozgás általi súlycsökkenés
bőr kötőszövetre gyakorolt hatásainak vizsgálata
in vivo nemlineáris mikroszkópiával egér
modellen**

Doktori értekezés

Dr. Lőrincz Kende Kálmán

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Prof. Dr. Wikonkál Norbert, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Varga Erika, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Krenács Tibor, DSc, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Somogyi Anikó, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Baltás Eszter, PhD, egyetemi docens
Dr. Nagy Géza, PhD, egyetemi tanársegéd

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	5
1.1 Az elhízás társadalmi vonatkozásai	7
1.2 Az elhízás kórtana.....	8
1.3 Metabolikus szindróma.....	15
1.4 Testsúlykontrol	17
1.5 Cukorbetegség	17
1.5.1 1-es típusú diabetes mellitus	18
1.5.2 2-es típusú diabetes mellitus	19
1.6 Az elhízás és cukorbetegség hosszú távú szövődményei	21
1.7 Az elhízás és cukorbetegség bőrgyógyászati vonatkozásai	22
1.8 Újgenerációs képalkotási eljárások a bőrgyógyászatban.....	26
1.8.1 Optikai koherencia tomográfia.....	28
1.8.2 Reflektancia konfokális mikroszkópia.....	29
1.8.3 Nemlineáris mikroszkópia.....	31
2. Célkitűzések	34
3. Módszerek	35
3.1 Egér modell és alkalmazott diéták	35
3.2 Önkéntes testmozgás bevezetése	37
3.3 Nemlineáris mikroszkópia (SHG, CARS)	38
3.3.1 Képalkotás	38
3.3.2 Technikai leírás.....	40
3.4 Szövetteni vizsgálatok	42
3.5 Statisztikai elemzések	44
3.6 Etikai háttér.....	44
4. Eredmények.....	47
4.1 Testsúly változása	47
4.2 SHG és CARS mérések	50
4.3 Szövetteni értékelés	56
5. Megbeszélés	61
6. Következtetések	67

7. Összefoglalás.....	69
8. Summary	70
9. Irodalomjegyzék.....	71
10. Saját publikációk jegyzéke	88
11. Köszönetnyilvánítás	90

Rövidítések jegyzéke

AE: after exercise
AK: aktinikus keratosis
AGE: advanced glycated endproducts
AGRP: agouti-related peptide
BAT : brown adipose tissue
BCC: basal cell carcinoma
BE: before exercise
BMI: body mass index
CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering
CO: control
DM: diabetes mellitus
FFA: free fatty acid
GWAS: genome-wide association studies
HF/ HFat: high fat
HFHF: high fat – high fructose
HFru: high fructose
IDF: International Diabetes Federation
IFG: impaired fasting glucose
IGT: impaired glucose tolerance
IR: inzulinrezisztencia
MC4/3R: melanocortin receptorok
MPT multiphoton tomography
MRI: Magnetic Resonance Imaging
NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMSC: non melanoma bőrtumorok
NPY: neuropeptide Y
OCT: optical coherence tomography
OGTT: orális glükóz tolerancia teszt
POMC: proopiomelanocortin
RCM reflectance confocal microscopy

SAT: subcutaneous adipose tissue
SCC: squamous cell carcinoma
SHG: second harmonic generation
T1DM: 1-es típusú diabetes mellitus
T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus
THG: third harmonic generation
Ti:S: titán-zafir
TPEF: twophoton excitation fluorescence
UCP: uncoupling protein
UH: ultrahang
UV: ultraviola sugárzás
VAT: visceral adipose tissue
WAT: white adipose tissue
WHR: waist/ hip ratio
WT: wild type
WvG: Weigert van Gieson
Yb: ytterbium

1. Bevezetés

Az elhízás és annak következményei, mint a metabolikus szindróma, valamint 2-es típusú diabetes mellitus előfordulása szignifikánsan növekszik világszerte [1, 2]. Ezek hátterében leginkább a túlzott tápanyagbevitel és elégtelen fizikai aktivitás áll [3]. A súlyos szövődmények, mint az érlemeszesedés, neuropathia, magas vérnyomás betegség, ischaemiás szív és központi idegrendszeri betegségek, vezető halálokokként jelentős egészségügyi kihívást jelentenek [4, 5]. Az elhízás, metabolikus szindróma és diabetes incidenciájának növekedése miatt egyre gyakrabban találkozhatunk azok bőrgyógyászati szövődményeivel is. A neuropathia, angiopathia és csökkent immunrendszeri védekezés talaján kialakuló fertőzésekre való hajlam, sebgyógyulási zavar és terápia rezisztens végtagi fekélyek tekinthetők ezek közül a legsúlyosabbaknak [6-9]. A hám barrier funkció csökkenése mellett az összes bőrgyógyászati szövődmény kialakulásában vitathatatlan szerepet játszanak a bőr kötőszöveteiben zajló molekuláris folyamatok. Az utóbbi időben egyre inkább a zsírszövet központi szerepére terelődött a hangsúly, melyre ma már egyszerű energiaraktár helyett, egy komplex sejthálózat alkotta multifunkcionális szervként tekintünk [10]. Túlzott felszaporodásakor a felszabaduló szabad zsírsavak és a bevándorló immunsejtek által termelt gyulladásozó cytokinek oxidatív stressz és mátrixdegradáló enzimikus folyamatok indukálásával és a fibroblastok gátlásával a környező kötőszövetek átépülését okozzák [10-14]. Ezt súlyosbíthatja a diabetesben tapasztalt magas glükóz szint miatti szöveti glikáció és a glikációs végtermékek felszaporodása [15]. Az elhízás és metabolikus szindróma belszervi szövődményeiért a viscerális, illetve ektopiás zsírszövet felszaporodását és az említett gyulladásozó folyamatokat teszik felelőssé [16, 17]. Ugyanakkor azt is bizonyították, hogy ugyanezek a negatív hatások a subcutan zsírszövet felszaporodásakor is megfigyelhetők. A következményes kötőszöveti átépülés hozzájárul a súlyos bőrgyógyászati szövődmények kialakulásához és progressziójához, így a megnövekedett bőr alatti zsírszövetréteg nem csak egy kozmetikai probléma [13, 14, 18-20].

Az utóbbi évek tudományos kutatásaiban egyre nagyobb hangsúlyt kap a kötőszöveti és a sejtkörüli mátrix átépülés, remodeling vizsgálata. A fentiekben leírtak alapján ennek, számos egyéb bőrbetegség mellett, az elhízás és diabetes szövődményei esetében is kiemelt jelentősége van. Az eltérések elemzésére és követésére korábban csak invazív beavatkozásként történő szövettani mintavételekkel volt lehetőség. Az elmúlt

évtizedekben a nemlineáris optika fejlődésével azonban, új típusú képalkotó eljárások kifejlesztése révén, lehetőség nyílt a bőr mikroszkopikus alkotóelemeinek non-invazív, magas felbontású *in vivo* vizsgálatára is. Nemlineáris mikroszkópia során az epidermis, dermis és subcutis különböző hullámhosszokon gerjeszhető endogén kromofórijait, mint a NADH, melanin, keratin, elasztin, kollagén és lipid kötések, vizsgálhatjuk jelölőfestés nélkül. Erre a kétfoton fluoreszcencia mikroszkópia (TPEF), másodharmonikus keltés (SHG) és koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS) technikák alkalmasak, melyeket ma már kombináltan is alkalmazhatunk [21-24].

Kutatócsoportunk egy konzorciumi projekt keretében részt vett az első hazai, *in vivo* képalkotásra is alkalmas, a medicina több területén is alkalmazható TPEF, SHG és CARS technikákat ötvöző berendezés kifejlesztésében. A projekt során számos humán és állati eredetű, beteg és egészséges bőrminta *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatát végeztük el [25-29]. A jelen értekezésben tárgyalt kísérletsorozat célja az elhízás és a testmozgás általi súlycsökkenés bőr kötőszövetre gyakorolt hatásainak vizsgálata volt *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával, különböző egérmodelleken [30-32].

1.1 Az elhízás társadalmi vonatkozásai

Az őskortól kezdve egészen a múlt század elejéig a nők telt alkata termékenységet, a férfiaké pedig jólétet és hatalmat szimbolizált több kultúrkörben párhuzamosan. Utóbbi bizonyítékeként maradtak fent azok a képzőművészeti alkotások, melyek telt nőket, lakmározó társaságokat, vagy éppen tekintélyes haskörfogattal bíró uralkodókat ábrázolnak. Mivel a teltség szorosan összefüggött a jómóddal, így a kívánt testalkat elérése nem adatott meg akárki számára.

A XX. század elejétől kezdve az iparosodás és technológiai fejlődés exponenciális gyorsulása következett be. Ennek sajnálatos módon közvetve a világháborúk lehettek a „gyújtóbombái”, mivel a hadakozás, majd az újjáépítés és az ellenlábask minden tekintetben való túlszárnyalása egyre inkább tüzelte ezt a folyamatot. Utóbbiak hatására jött létre a távközlés és informatika tudománya, melyek összefonódása és robbanásszerű fejlődése pár évtized alatt olyan radikálisan változtatták meg a világunkat és a mindennapi életünket, hogy azt a legidősebb nemzedékek valóságos időutazásként élhetik meg. Ennek hátterében a legfontosabb folyamatként az információ szabad áramlása áll, melynek egyaránt vannak pozitív és negatív hatásai is. A teljességre törekvés nélkül kiemelendő a kereskedelem felgyorsulása, a tudományra gyakorolt hatása mellett a nagyobb tömegek számára elérhetővé tett világismereti tájékozottság is. Ugyanakkor közvetve ehhez kapcsolható a „fogyasztói társadalom” kialakulása, a nyereségérdekeltség és haszonközpontúság maximalizálódása is. Ez azt eredményezi, hogy az ember sokszor olyan dolgokra vágyik és szerez be, amelyekre valójában nincs életbevágó szüksége. Ugyanez jellemző az élelmiszerekre, azon belül is főként a készételekre. A „fejlett nyugati” társadalmakban mind az alapanyagokból, mind pedig a készételekből túlprodukciónak van, mely felesleget eredményez. Az ételdömping hatására az élelmiszerek ára jelentősen mérséklődött, hozzáférhetősége széles körben nőtt, ugyanakkor minősége bizonyos tekintetben csökkent. Mivel ezeknek az élelmiszereknek a globális, helyi szükségleteknek megfelelő szétosztása továbbra is utópisztikus elképzelés, így azok helyben történő elfogyasztásának irányába terelődik a hangsúly. A nem szélsőségesen szegény országokban gyakorlatilag az alacsonyabb társadalmi rétegek is bőségesen étkezhetnek, így a teltség továbbá nem csak a gazdagok privilégiuma. Sok esetben éppen ellenkezőleg, a tehetősebb és tájékozottabb rétegek odafigyelnek az elhízás elkerülésére, és a manapság divatos sportos testalkat elérésére törekszenek. Ennek ellenére az elhízás

sokáig töretlenül, mondhatni járványszerűen terjedt, de ez a trend az utóbbi években az Egyesült Államokban vesztett lendületéből [33]. 1988 és 2012 között az elhízás korhoz illesztett prevalenciája a teljes lakosságot tekintve 22,9-ről 34,9 %-ra nőtt a teljes lakosságot tekintve [34]. 2013-14 között a prevalencia stabil maradt a férfi populációban, de nőknél 40.4 %-ra emelkedett [35]. Magyarországon az elmúlt 25 év alatt szintén szignifikánsan emelkedett az előfordulása. Egy új felmérés szerint a férfiak 40%-a túlsúlyos és 32%-a elhízott. A női populációban mindkét esetben 32%-ot mértek [36]. Ebből látszik, hogy a hazai adatok valamivel kedvezőbbek, de hasonló trendet mutatnak a teljes lakosságra vetítve. A helyzetet súlyosbítja, hogy az étvággal párhuzamosan általában nem növekszik a testmozgás iránti ellenállhatatlan vágy, így a folyamatosan fennálló pozitív energiamérleg hatására szervezetünk zsír formájában energiaraktározást végez. Amennyiben utóbbi túl nagy mértéket ölt, úgy a teltkarcsúságon, majd kövérségen túlmutató elhízás (obesitas) alakul ki.

A fenti adatokból is látszik, hogy az elhízás korunk egyik legelterjedtebb népbetegségévé vált a szív-érrendszeri, anyagcsere betegségek közül a cukorbetegség és megelőző állapotai, daganatos valamint függőséggel járó betegségek mellett. Kiemelkedő jelentősége abban rejlik, hogy a felsorolt betegségek kialakulásához sokszor éppen az elhízás, valamint annak hosszas fennállása vezet!

1.2 Az elhízás kórtana

Az elhízást a zsírszövet felhalmozódásával jellemezhetjük. Ilyenkor a test, felnőttekben átlagosan 20% körüli, zsírtartalma kóros mértékben megnövekszik, és potenciálisan egészségkárosodásához vezethet [30].

Utóbbi pontos lemérése technikailag lehetséges, például MRI vizsgálattal, de ezekre a költséges mérésekre konzekvencia hiányában ritkán kerül sor. Ugyanakkor a testzsír százalék impedancia elemzéssel, mely már a felsőkategóriájú otthoni mérlegekben is elérhető, viszonylag pontosan megbecsülhető.

Ennek ellenére a mai napig a legelterjedtebb és egyben legegyszerűbb módszer az elhízás objektivizálásra és a kockázatbecslésre a testtömegindex és derékkörfogat meghatározása [37]:

-Testtömegindex (body mass index), BMI: testsúly (kg)/ testfelület (m²):

- <18,4 alultáplált
- 18,5-24,9 normális
- 25-29,9 túlsúly
- 30-34,9 I. fokú elhízás
- 35-39,9 II. fokú elhízás
- 40> III. fokú, extrém elhízás

-Derék körfogat: spina iliaca anterior superior és az alsó bordavonal között félúton mért körfogat:

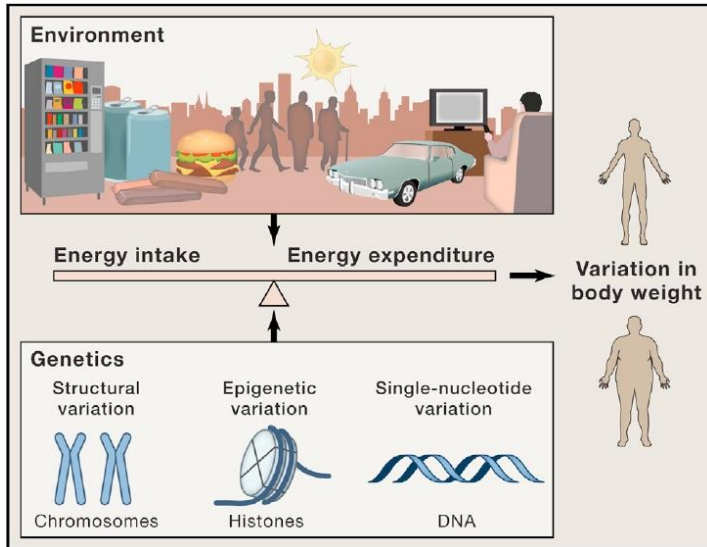
- férfiaknál 102 cm felett,
- nőknél 88 cm felett kóros

Utóbbiak átlagos testalkattal rendelkező felnőttekre vonatkoznak. Természetesen találkozhatunk olyan esetekkel is, amikor a kiugró értékek mögött nem elsődlegesen a tápanyagforgalom zavara, hanem például testépítés, versenysport, vagy akár genetikai defektus áll.

A fentiekből kitűnik, hogy 25-ös BMI felett túlsúlyról, 30 felett pedig definitív elhízásról van szó. Ezt a két kategóriát a késői egészségügyi szövődmények relatív, illetve abszolút kockázatának tekintik. A valóságban azonban ennél árnyaltabb a helyzet, hiszen a megfigyelések szerint a BMI egyedül nem alkalmas a kockázatbecslésre. Ez abból fakad, hogy a nők és a férfiak alapvetően másképp híznak. Előbbiekre a női, körte típusú, míg a férfiakra a centrális, alma típusú elhízás jellemző. Ennek objektivizálását szolgálja a fentiekben említett derék körfogat meghatározása. Amennyiben a derékkörfogat és a trochanter majorok magasságában mért csípőkörfogat hányadosa (waist/ hip ratio, WHR) nőknél a 0,85-öt, férfiaknál a 1,0-át meghaladja, úgy centrális, vagy más néven abdominális, alma típusú elhízásról beszélhetünk. Amennyiben magas BMI mellett alacsony WHR-t kapunk, úgy csípőre lokalizálódó, gynoid, vagy más néven körte típusú elhízásról beszélhetünk. Természetesen a legtöbb esetben kevert típusú zsírlerakódást látunk, mindazonáltal az egyértelműen abdominális típus sokszoros kockázatot jelent, melynek okait lentebb tárgyaljuk.

Az elhízás oka legtöbbször az életmódból adódó fokozott táplálékfelvétel és fizikai inaktivitás a háttérben álló genetikai hajlam mellett [38]. Utóbbi kapcsán meg kell említenünk a leptin hormont, melyet a zsírszövet termel és a hypothalamuson keresztül az étvágy szabályozásáért felel. Felfedezése a véletlennek köszönhető, amikor is egy vizsgált egérpopuláción belül egy adott csoport kontrollálatlanul enni és hízni kezdett [39]. Ennek hátterében a leptin hormon hiánya, illetve az azt kódoló *ob* gén mutációja igazolódott. Ez jelentős mérföldkő volt, mivel kimutatták, hogy a leptint legnagyobb részben a zsírszövet termeli, ami a zsírszövet endokrin szerepére derített fényt. Ezt követően a zsírszövet által termelt hormon jellegű és jelátvitelt célzó molekulákat, amilyen a leptin is, adipo(cyto)kineknek nevezeték [40]. A leptin hiányos, kontrollálatlan étvágyú, *ob/ob* mutáns egerek mellett a leptin receptor hibájával bíró szintén hiperfág *db/db* egérmodellt a mai napig használják a metabolikus szindróma és diabetes modellezésére [41]. Érdekesség ugyanakkor, hogy emberben az *ob/ob* egérhez hasonló genetikai hiba igen ritkán jelentkezik, azt csupán gyermekek extrém fokú elhízásánál kell kizárni. Obes betegeknel éppen ellenkezőleg, magas leptin szintet találtak, mely leptin rezisztenciára, és annak az elhízásban betöltött szerepére utal. Továbbá azt is megfigyelték, hogy a leptinnek az embereken kifejtett étvágycsökkentő hatása csak kifejezetten magas leptin szint felett jelentkezik. Emiatt azt feltételezik, hogy a leptinnek inkább az étvágyat fenntartó szerepe van, mely nem engedi, hogy túl keveset együnk [42]. Mint azt említettük, a leptin a hypothalamuson keresztül fejt ki hatását, egyrészt a zsírlerakódás ellen ható anorexigén válasz indukálásával. Ebben a jelátviteli útvonalban résztvevő további központi idegrendszeri transzmitterek, mint a proopiomelanocortin (POMC), az α , β és γ MSH melanocortin peptidek, továbbá az utóbbiak által stimulált 3-, 4- melanocortin receptorok (MC4R and MC3R) génjei érintettek. Másrészt a leptin az orexigén útvonalat akadályozza az agouti-related peptide (AGRP) és neuropeptide Y (NPY) gátlásán keresztül. Ezekkel együtt több mint 40 gén hibáját azonosították már, melyek kóros súlytöbbletchez vezethetnek, ugyanakkor ezek csak az esetek kisebb részében felelősek az elhízásért [38, 43-49]. Emellett azonban számos, a hypothalamusban expresszálódó gén esetében találták meg az adott génnek több olyan variánsát, melyek az energiaháztartást szorosan befolyásolják. Így a genom áttekintő megismerését célzó vizsgálatok (genome-wide association studies, GWAS) alapján elmondható, hogy az elhízás egy komplex folyamat, melynek hátterében a genetikai

hajlamot több gén hibája vagy polimorfizmusa, illetve az epigenetikailag jelentős gén-környezet interakciók okozzák (1. ábra) [38, 50-53].



1. ábra: A környezet és a genetikai háttér energiamérlegre gyakorolt hatása. Az ábra a [38]. hivatkozási számmal ellátott összefoglaló közleményből származik.

A fentiek mellett az étvágy szabályozásában egyéb, az emésztés elősegítésében közreműködő emésztőrendszeri peptidok is részt vesznek, mint a kolecisztokinin, gastrin-releasing peptid, neuromedin B, bombesin, glukagonszerű peptid 1 és az enterostatin.

Az egyes étkezések befejezésében, a monoamin neurotranszmittereknek, mint a noradrenalin, dopamin és szerotonin is szerepük van. Ezen kívül a táplálékfelvétel efferens szabályozásában a vegetatív autonóm szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer, továbbá az endokrin rendszer bizonyos elemei, mint például a növekedési hormon, pajzsmirigyhormonok, tesztoszteron, ösztrogének, glükokortikoidok és az inzulin is részt vesznek.

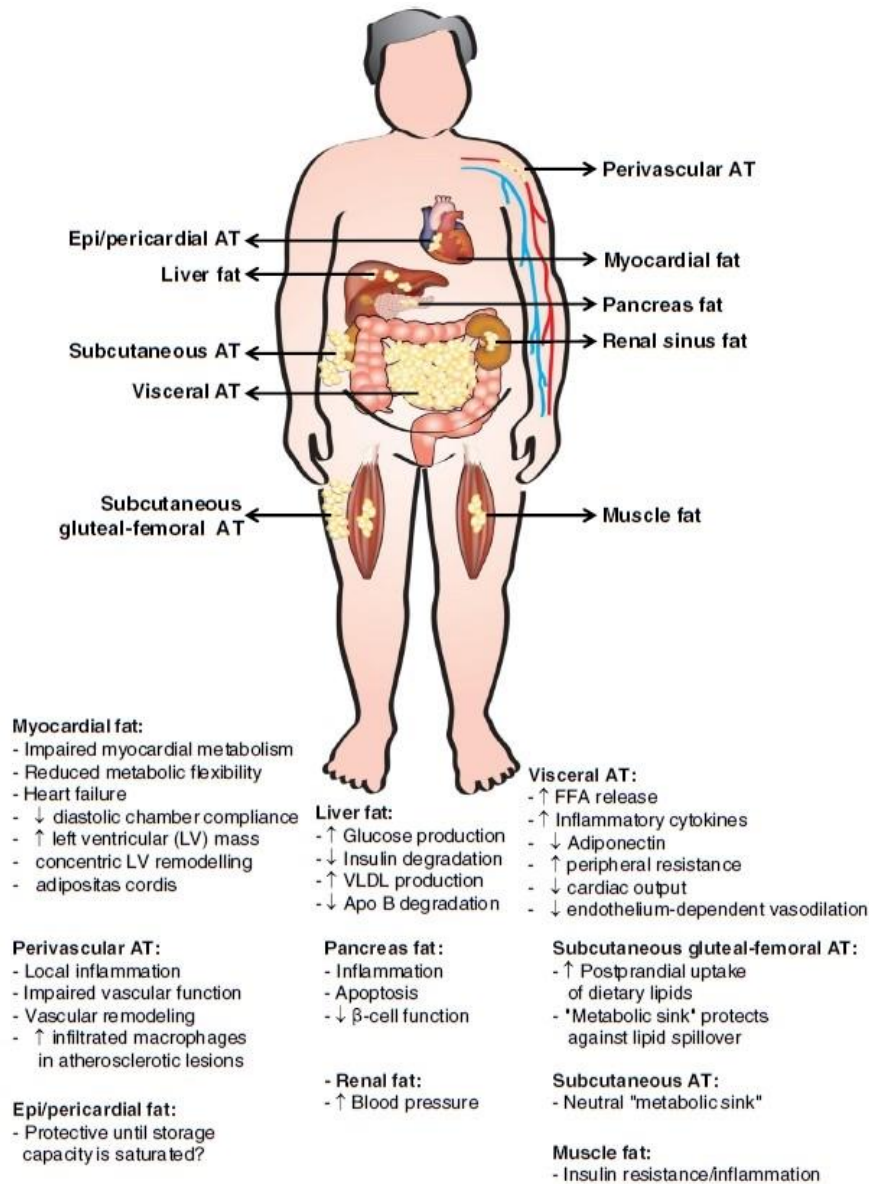
A fentiekből adódóan az elhízásnak ritkábban másodlagos okai is vannak. Ilyen lehet a pszichés komponens, az úgynevezett „stressz evés”, továbbá endokrinopathiák közül a Cushing kór, hypothyreosis, tesztoszteron hiány. Ezek mellett ritkábban központi idegrendszeri okként például hypothalamus vagy hypophysis daganat fordulhat elő [54].

Az ideális testsúly feletti gyarapodás során a zsírmentes testtömeg $\frac{1}{4}$, a zsírszövet pedig $\frac{3}{4}$ részét teszi ki a feleslegnek. Előbbit a megnövekedett terhelés következtében kialakuló kötő és támasztó, illetve izomszövet-többlet adja. Korábban úgy vélték, hogy a zsírsejtek száma adott, és csak méretükben változnak, mára azonban ismert, hogy a

zsírszövet felszaporodásakor a zsírsejtek számban (hypertrophia) és méretben (hyperplasia) is növekednek.

Az adipociták legfőbb szerepe a lipidek raktározása, elsődlegesen trigliceridek formájában. Ezekből katabolikus szignálok hatására energia mobilizálható az alapanyagcsere fenntartására, valamint megnövekedett szükséglet, mint például stressz, fizikai aktivitás, termogenezis esetén. Emellett mechanikus és termikus védelmet is biztosítanak a vitális szervek részére. Utóbbi esetében fakultatív és adaptív termogenezist különböztethetünk meg. Ennek elsősorban újszülött és gyermekkorban van kiemelt jelentősége. Ez abból is látszik, hogy a hőtermelésért felelős mitokondriális „szétkapcsoló” fehérjék (uncoupling protein – UCP) főként a barna zsírszövetben (brown adipose tissue, BAT) találhatóak meg, melynek mennyisége az idő előrehaladtával szignifikánsan csökken. Felnőttkorban legnagyobb mennyiségben fehér zsírszövetet találunk (white adipose tissue, WAT) különböző lokalizációkban.

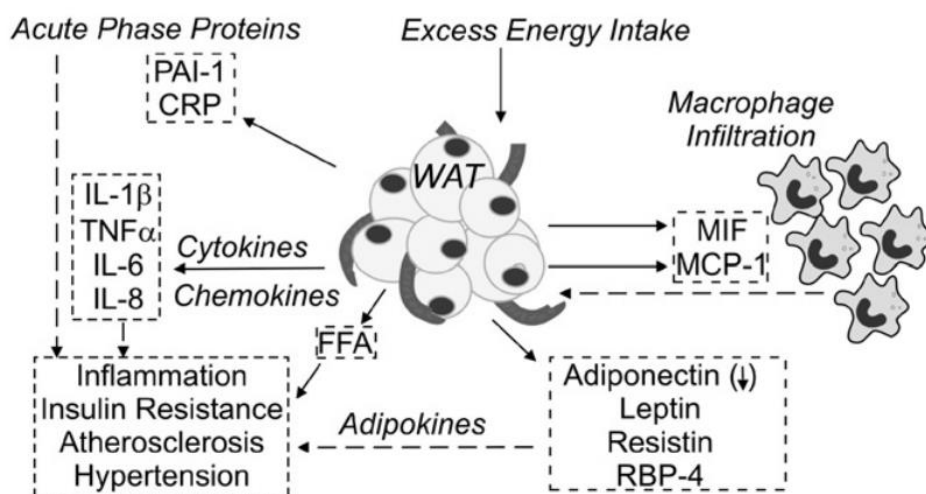
A gynoid elhízást okozó bőr alatti zsírszövet (subcutaneous adipose tissue, SAT) felszaporodásához, korábban lényeges egészségügyi kockázatnövekedést nem társítottak [55, 56]. A belszervi, illetve metabolikus szövődmények szempontjából ugyan kisebb jelentőségű a direkt szerepe, ugyanakkor a bőrkötőszövetre gyakorolt hatásai korántsem elhanyagolhatók. Korábbi kísérletek bizonyították, hogy a BMI-vel arányos mennyiségben megnövekedett SAT szignifikáns kötőszöveti átépülést okoz, melynek ismertek későbbi bőrgyógyászati szövődményei [13, 19]. Továbbá elhízás során elsődlegesen a SAT-ben kezdődik meg a lipidek raktározása. Amennyiben ez egy bizonyos határt elér, és a zsírszövet eléri a maximális expanziót, a túlsorduló lipid többlet szabad zsírsavak (free fatty acid, FFA) formájában a keringésbe kerül, majd a zsigerek közti, illetve egyéb szervek körüli ektópiás zsírszövetekben raktározódik el [16]. Legkiemelkedőbb jelentősége a zsigerek körüli zsírszövetnek (visceral adipose tissue, VAT) van. Utóbbi felelős a már említett abdominális elhízásért és annak negatív következményeiért. Emellett további belső szervek, mint a vesék, máj, hasnyálmirigy, valamint nem utolsósorban a szív és az erek körül is találhatunk ektópiás zsírszövetet, melyek kóros felszaporodásához kapcsolódó következményeket a 2. ábra foglalja össze [16].



2. ábra A különböző lokalizációban megtalálható zsírszövet eloszlása és felszaporodásának következményei. Az ábra a [16]. hivatkozási számmal ellátott összefoglaló közleményből származik.

Ahogy azt már korábban is említettük, a zsírszövetre ma már nem csak egyszerű energiaraktárként tekintünk, hanem mint endokrin szervre és a metabolikus homeosztázis szabályozójára is egyben [10]. A zsírszövet összetételében az adipocitákon kívül számos más sejtet is megtalálhatunk az extracelluláris mátrixba ágyazva. Ezek közül kiemelendők a prae adipociták, fibroblastok, vasculáris endothel sejtek és különböző immunsejtek. A limfociták, hízósejtek, eozinofilek, neutrofilek és makrofágok jelenléte fiziológiás, de a számuk és eloszlásuk egyéb lokális faktorok függvénye. A zsírszövet felszaporodása egy proinflammatorikus állapotot hoz létre. A neutrofilek, regulátor T sejtek és makrofágok zsírszöveti infiltrációja mellett utóbbiak alcsoportjaiban egy M2 >

M1 irányú eltolódást figyelhetünk meg [11]. Ezáltal a zsírszövetben megnő az adipokinek és cytokinek termelődése, melyek többsége jól ismert gyulladásos cytokin, mint a TNFalfa, IL-6, IL-18 [17, 57]. (3. ábra)



3. ábra Az ábrán a felszaporodó fehér zsírszövet esetén végbemenő celluláris és molekuláris folyamatok láthatóak. A makrofág infiltráció mellett a gyulladásos cytokinek felszabadulását láthatjuk, illetve azok egészségügyi következményeit. Az ábra az [57]. hivatkozási számmal ellátott összefoglaló közleményből származik.

A gyulladásos válaszreakciók következtében felszaporodnak a reaktív nitrogén és oxigén gyökök, melyek az oxidatív stressz fokozódásához vezetnek [58, 59]. Ezzel együtt a mátrix degradáló enzimek, proteázok, elasztázok expressziója is nő. A zsírszöveti gyulladásos folyamat a környező sejt körüli mátrix és kötőszövet átalakulásához, remodellingjéhez vezet. Ennek az elsődleges szerepe a zsírszövet expansziójának, azaz kiterjedés növekedésének lehetővé tétele [10, 11]. A megnövekedett zsírsejtekből szabad zsírsavak kerülnek a keringésbe, melyeknek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak az elhízáshoz kapcsolódó anyagcsere betegségek kialakulásában, mivel már rég leírták, hogy csökkentik az inzulin szekréciót és az inzulin mediált cukorfelvételt egyaránt [60]. Emellett a nagy mennyiségű FFA által felszaporodó ektópiás zsírszövetekben az említett adipocytokinek által mediált gyulladásos folyamatok indukálódnak. A gyulladásos mediátorok mellett ugyanakkor ellentétes hatású, antiinflammatorikus adipokinek is termelődnek. Az említett negatív folyamatok mérséklésében az adiponectin szerepét tartják a legjelentősebbnek, mivel csökkenti a szérumban lévő FFA koncentrációt és a gyulladásos folyamatokat gátolja. Több vizsgálat bizonyította, hogy a magasabb adiponectin szint

jelentősen csökkenti a metabolikus szindróma, 2-es típusú diabetes és azok cardiovascularis következményeinek kockázatát [61]. A leírt gyulladásos folyamat klasszikus értelemben vett, klinikailag is detektálható gyulladást okoz, melyet az emelkedett gyulladásos markerek, mint a CRP követésével detektálhatunk. Elsődlegesen a szív- érrendszeri kockázatok kialakulásának előrejelzésében lehet szerepük. Ugyanakkor ezek emelkedése számos más tényezőtől is függ ezért a prediktív erejük bizonytalan. Követésüket inkább csak opcionális, mint rutin vizsgálatként javasolják [62].

A fent említett gyulladásos folyamatok extrém gyulladásos marker emelkedést nem okoznak. Lefolyásuk nem összehasonlítható például egy súlyosabb infektív háttérű állapottal. Ugyanakkor a relatíve kismértékű gyulladás krónikus fennállása, a többszörös belső szervi érintettségen keresztül anyagcsere betegségek, mint a dislipidaemia, inzulin rezisztencia, 2-es típusú diabetes és szív- érrendszeri betegségek kialakulásához vezet [63].

1.3 Metabolikus szindróma

A metabolikus szindrómát 1988-ban írták le. A megfigyelés szerint szoros összefüggést találtak a 2-es típusú diabetes, emelkedett vérzsír értékek, magas vérnyomás és az ezekből adódó életveszélyes cardiovascularis szövődmények között. A későbbiekben megállapították, hogy ezek háttérében az elhízásnak kiemelt szerepe van a genetikai hajlam, és a mozgásszegény életmód mellett. Az abdominális elhízásnak közvetlen szerepe van az inzulin által irányított szisztémás glükóz és szabad zsírsav felhasználás inzulin rezisztencia okozta csökkentésében. Az inzulin rezisztencia, hyperglycaemia és proinflammatorikus adipocytokinek endothel diszfunkcióhoz, magas vérnyomáshoz, dislipidaemiához és atherogén lipidprofilhoz, majd atherosclerotikus szív- érrendszeri betegségekhez vezetnek [64].

A korábban leírt kritériumrendszert többször módosították, és annak ellenére, hogy ma sem teljesen egységes, a lényege változatlan maradt. Az abdominális, azaz a zsigereket és belső szerveket érintő elhízás alapkövetelmény, tehát a legtöbb esetben a kiindulási alapja a tünetegyüttesnek. Egy korábbi vizsgálat szerint az ideális testsúllyal rendelkezők 5%-ánál, a túlsúlyosok 22%-ánál és az elhízottak 60%-ánál állapították meg a metabolikus szindrómát [65].

A nemzetközi diabetes szövetség (International Diabetes Federation, IDF) szerint a metabolikus szindróma diagnózisának követelményei [66]:

- Alapfeltétel a megnövekedett derékkörfogat: férfi ≥ 94 cm, nő ≥ 80 cm
(A klinikai gyakorlatban gyakran a korábbi értékeket használják:
férfi ≥ 102 cm, nő ≥ 88 cm)

Emellett a következők közül további két pontnak kell teljesülnie:

- Szérum triglicerid szint $\geq 1,7$ mmol/L
- HDL koleszterin férfiakban $<1,03$ mmol/L, nőkben $<1,29$ mmol/L
- Vérnyomás $\geq 130/85$
- Éhgyomri (éhom) szérumban glükóz $\geq 5,6$ mmol/L

A metabolikus szindróma diagnosztizálásához nem szükséges, csak opcionálisan végezhető a cukorterheléses vizsgálat (orális glükóz tolerancia teszt, OGTT). Magasabb vércukorértékek esetén mindenesetre javasolt a manifest 2-es típusú diabetes diagnózisának felállításához, vagy kizárásához.

A cukorterhelés során a reggeli éhomi vércukormérés után 75g glükózt tartalmazó vizet kell elfogyasztani, majd két óra elteltével ismételt vércukorszint meghatározás történik. Amennyiben az éhomi vércukor többszöri mérés után is $5,6$ mmol/L felett van Impaired Fasting Glucose (IFG) – ról beszélhetünk. Ezt a magyar szakirodalomban is csak az angol kifejezéssel illetik. Glükóz terhelés után 2 órával $7.8 - 11.1$ mmol/L közötti értékek esetén csökkent glükóz toleranciáról beszélhetünk (impaired glucose tolerance, IGT). Az IGT-nek nem feltétele az IFG, tehát normális éhomi érték mellett is előfordulhat. Amennyiben többszöri mérés után is 7.0 , vagy OGTT után 11.0 mmol/L feletti értéket észlelünk, úgy felállítható a diabetes diagnózisa. Amennyiben utóbbi még nem bizonyítható, úgy a metabolikus szindrómához kapcsolódó emelkedett éhomi glükóz szint inzulinrezisztenciára (IR) utalhat. Ebben az esetben a megfelelő inzulin elválasztás ellenére is a normálisnál magasabb vércukorértékeket kapunk.

Az IR mögött több ok állhat, mint ritka genetikai eltérések, autoimmunitás, endokrin eltérések, terhesség, polycystás ovarium szindróma, melyek azonban lényegesen

ritkábbak, mint az obesitashoz és metabolikus szindrómához kapcsolódó IR. Ennek hátterében a genetikai hajlam mellett a zsírszövetből felszabaduló adipocytokineket, a diszregulálódó szabad zsírsav anyagcserét és a magas vércukorszint β - sejteken kifejtett negatív hatásait véleményezik. Utóbbi esetében az inzulin gén expressziójának csökkenését figyelték meg [67, 68]. A metabolikus szindróma, IR, IFG és IGT a 2-es típusú diabetes megelőző állapotainak tekinthetők, melyek hosszú évekig fennállhatnak a manifesztálódó cukorbetegség előtt. Éppen emiatt a korai felismerésük esetén a megfelelő életmódváltás visszafordíthatja a folyamatot.

1.4 Testsúlykontrol

Az elhízás kezelésének legfőbb eleme a testsúlykontrol. Elsőként a hízás megállítása, majd az egyenletes fogyás elérése a cél. A kezelés fő szempontjai a kalóriabevitel csökkentése, mozgásterápia és viselkedés-, vagy szükség esetén pszichoterápia.

Első lépésben meghatározzuk, hogy szükséges-e súlycsökkentés. Itt 30 feletti, vagy egyéb kockázati tényezővel párosulva 25 feletti BMI érték a határ. A testsúlytól függően meghatározzuk az elvárt csökkenést. Alapvetően nem feltétel az ideális BMI elérése, mivel már 5%-os csökkenés is kimutatható előnyökkel bír. Inkább az egyenletes fogyáson és az eredménymegtartáson van a hangsúly. A diéta előírásánál javasolt teljes értékű étrendet választani csökkentett kalóriatartammal. 500-700 kcal/nap energiadeficitet érdemes előirányozni, nőknél 1200-1500 kcal/nap, férfiaknál 1500-1800 kcal/nap célértékkel. Ezek mellett azonban elengedhetetlen a rendszeres testmozgás is. Legalább 200-300 perc/hét közepes, vagy magas intenzitású, rendszeres sporttevékenység végzése javasolt. Terápiarezisztencia esetén, 40 feletti BMI-nél, az elhízás sebészi kezelése mérlegelendő [69].

1.5 Cukorbetegség

A cukorbetegség tulajdonképpen egy igen tág és diverz betegségcsoportot jelöl, melynek középpontját a szénhidrátháztartás szabályozásának zavara adja. Ennek hátterében azonban több, különböző patomechanizmusú okot azonosítottak.

Az etiológia alapján történő osztályozás szerint az alábbi főcsoportokat különböztetjük meg:

- 1-es típusú diabetes mellitus: immunológiai vagy idiopathiás eredetű forma, melyben a pancreas β -sejtjeinek a károsodása abszolút inzulinhiányhoz vezet.
- 2-es típusú diabetes mellitus: háttérben relatív inzulinhiány van, inzulin rezisztencia és/vagy inzulin kiválasztási defektussal.
- Gestációs diabetes mellitus: várandósság alatt fellépő szénhidrátháztartási zavar.
- Specifikus kórformák: génhibák, genetikai szindrómák, fertőzések, gyógyszerek, endokrinopathiák okozta cukorbetegség.

A fentiek közül a disszertációban csak a dolgozat szempontjából releváns 1-es és 2-es típusokat részletezzük [70].

1.5.1 1-es típusú diabetes mellitus

Az egyes típusú cukorbetegség kialakulása nincs összefüggésben az elhízással. Háttérben autoimmun mechanizmusok állnak, sokszor genetikai hajlam talaján, mely miatt sokszor már a gyermekkorban kialakul a betegség. Utóbbi alátámasztja, hogy a beteg több mint ötödének pozitív a családi anamnézise és nagyon gyakoriak a különböző HLA asszociációk. A cukorbeteg populáció összességét nézve, az 1-es típus csak az esetek 1/10-ért felel. Bár gyakorisága a 2-es típushoz képest elhanyagolható, bőrgyógyászati relevanciája mégiscsak kiemelkedő a társuló bőrbetegségek miatt. Háttérben a hasnyálmirigy inzulintermelő β -sejtjeinek pusztulása áll. Ennek háttérben legtöbbször autoimmunitás áll, melyet alátámaszt a Langerhans szigeten autoreaktív T-sejtek általi infiltrációja és a különböző szigetsejt ellenes autoantitestek gyakori megjelenése. A manifeszt cukorbetegség kialakulásáig a hasnyálmirigy Langerhans szigeteiben található β -sejtek döntő többségének el kell pusztulnia. Emiatt egy abszolút inzulinhiány alakul ki, szemben a korábban már ismertett IR esetében tapasztal relatív inzulinhiánnyal. Ez a szénhidrátháztartás súlyos zavarához vezet, mely már nagyon korán alarmírozó tüneteket okozhat. Emiatt a még fel nem ismert 1-es típusú cukorbetegség könnyen diabeteses kómába torkollhat. Az inzulinnak fiziológiásan anabolikus hatása van, mivel a vérben jelenlevő glükóz izom és zsírsejtekbe történő felvételét indítja be. A

sejtek által felvett glükózból a rövid távú energiaraktározásra alkalmas glikogén és a hosszútávú raktározásra alkalmas zsír szintetizálódik. Amennyiben az inzulin abszolút mértékben hiányzik, úgy hiába van jelen a glükóz, a szervezet nem képes felhasználni. Emellett az anyagcsere katabolikus irányba tolódik el. Utóbbi miatt zsírbontás indul be, mely során ketontestek szabadulnak fel nagy mennyiségben. Ezeket létfontosságú szervek egy bizonyos mértékig fel tudják használni a sejtfunkciók fenntartásához súlyos energiadepláció esetén. Nagy mennyiségben azonban a ketosis metabolikus acidosis irányába tolja el a sav-bázis egyensúlyt, melyek következtében émelygés, hányás és szapora légvétel alakul ki. Ilyenkor jellegzetes acetonszagú leheletet észlelhetünk a betegen. Az ion és folyadékháztartás felborulása kiszáradáshoz vezet, melyet súlyosbít a kifejezetten magas vércukorszint ozmotikus hatására kialakuló sejten belüli folyadékhiány is. A neuronok folyadékvesztése hamar tudatzavarhoz, eszméletvesztés kialakulásához vezet. Szerencsére ezzel a korai, életet veszélyeztető szövődménnyel csak ritkán találkozunk. Ismert cukorbetegség esetén a beadott inzulin nem megfelelő mennyisége, illetve a megnövekedett inzulinigény, mint például diétahiba, emésztőrendszeri betegségek, fertőzések, okozhatnak ketoacidotikus kómát [70].

Kezelési lehetőségként 1-es típusú diabetesben csak az inzulin pótlása jön szóba, melyet rekombináns technológiával előállított bőr alatti injekciós human inzulinnal végzünk. Ma már adhatunk ultragyors, gyors, elhúzódó és kevert gyors és elhúzódó hatású inzulinkészítményt is. Az étkezésekhez illesztett önadagolás sikerességének a kulcsa a pontosan kiszámított szénhidrát tartalmú diéta betartása. Diétahiba esetén, ha túl keveset eszik a beteg, vagy ha az inzulin igény alacsonyabb például sport esetén, a szokásos adag beadása a vércukorszint túlzott csökkenéséhez vezet, mely szintén heveny rosszulléttel járó állapotot okoz. Ez gyakori korai szövődmény, de könnyen orvosolható és hosszútávú hatásai nincsenek. Gyakoribb a diétahiba következtében hosszasan fennálló célérték feletti vércukorszint, mely a diabetes késői szövődményeiért felelős. Ebben az esetben a fent leírt diabetes által indukált kómás állapottól eltérően nem egy kiugróan magas értékről van szó, így rövidtávon nem okoz panaszt [70].

1.5.2 2-es típusú diabetes mellitus

A 2-es típusú diabetes az esetek 9/10-ét adja, szignifikánsan gyakoribb az 1-es típusnál, és ahogy korábban írtam előfordulása folyamatosan növekszik. Ez abból adódik,

hogy leggyakrabban a „jóléti”, azaz metabolikus szindróma talaján alakul ki, melynek háttérében az egyre növekvő előfordulású elhízás áll. Természetesen itt sem elhanyagolható az örökletes hajlam, mivel ismert, hogy cukorbeteg szülő esetén szignifikánsan magasabb a betegség kialakulásának kockázata [61, 70].

A betegség kialakulása során ellentétben az 1-es típussal egy relatív inzulin hiányról beszélhetünk. A metabolikus szindróma leírása során részletezett inzulin rezisztencia miatt csökkent a glükóz szenzitív sejtek cukorfelvétele. A keringésben jelenlevő inzulin mennyisége emiatt kompenzatórikusan megnő, mely az éhségérzetet fokozza. Utóbbi az elhízás súlyosbodását okozhatja. A magas inzulinszint emellett az inzulin receptorok kifejeződésének down regulációját is fokozza, ami az IR további súlyosbodásához vezet. A fentiek hatására a hasnyálmirigy inzulintermelő kapacitása idővel kimerül. Időnként az inzulin kiválasztásának zavarát már korai stádiumban megfigyelik, melynek háttérében az amyloid polipeptid β sejtekben történő lerakódását feltételezik [70-72].

A 2-es típusú cukorbetegség ellentétben az 1-es típussal lassan alakul ki és sokszor mellékleleteként derül ki egy rutin laborvizsgálat során. Amennyiben sokáig felderítetlen marad a diagnosztizálása idején már súlyos szövődeményekkel járhat. Ellentétben az 1-es típussal itt egy kiegyensúlyozottabb anyagcsere állapot van, melyben a ketoacidotikus kómához hasonlóan hirtelen kialakuló alarmírozó állapot ritkán fordul elő. Tartósan extrém magas vércukorszint esetén hiperozmoláris kóma alakulhat ki, melynek patomechanizmusa némileg hasonló a ketoacidotikus kómához. Ez jellemzően magasabb, 30 mmol/L körüli, vércukorérték esetén jön létre. A hiperozmolaritás miatt fokozott a vizelet kiválasztás, mely kiszáradáshoz és elektrolit egyensúlyzavarhoz vezethet. Emellett a megnövekedett cukorkoncentráció ozmotikus hatására a sejtek vizeit vesztenek, mely a neuronok esetében súlyos tudatzavarhoz vezet. Ugyanakkor a keringésben jelenlevő, de elégtelen mennyiségben termelt inzulin megakadályozza a direkt lipidbontásból származó ketontestek képződését. Ilyenkor akut esetben a parenterális folyadék és ionpótlás mellett exogén inzulinbevitelre lehet szükség [70, 71].

A T2DM kezelésekor elsőként orális antidiabetikum (OAD) mono-, vagy kombinált terápiát adhatunk a betegnek, mely a megfelelően betartott szénhidrátszegény diéta mellett általában elegendő a vércukor célérték tartásához. Az OAD-ok általában az endogén inzulin hatását potenciózzák, vagy az inzulin receptorokat érzékenyítik. Ebből

kifolyólag csak az endogén inzulin termelés megőrzéséig alkalmazhatóak kellő hatékonysággal. Amennyiben a tartalékok kimerülnek és a célértékek nem tarthatóak, úgy inzulinadás bevezetése szükséges. Utóbbi történhet állandó-, vagy csak átmeneti jelleggel az inzulinigényt negatív vagy pozitív irányban befolyásoló tényezők függvényében. Fizikai aktivitás pl. csökkenti az inzulinigényt, de kortikoszteroid kezelés, stressz, infekciók növelhetik is. Amennyiben a beállított kezelés elégtelen, vagy folyamatosan diétakihágások történnek, úgy a tartósan célérték feletti vércukornál szignifikánsabb nagyobb arányban jelentkeznek súlyos hosszú távú következmények [71, 72].

1.6 Az elhízás és cukorbetegség hosszú távú szövődményei

Az elhízás egyértelműen legveszélyesebb következménye a metabolikus szindróma, illetve 2-es típusú diabetes. Emellett azonban önmagában is hajlamosít zsírmáj, atherosclerosis, coronaria meszesedés, nyaki nagyér meszesedés, általános érlemeszesedés, ischaemiás szívbetegség, ischaemiás stroke, alsó végtagi thrombosis, thrombemboliás szövődmények, alvási apnoe szindróma, cholecystolithiasis, arthrosis és malignus betegségek előfordulására [73-75]. Emellett összefüggésbe hozták a depressio, dementia és különböző hormonzavarokkal is. Utóbbinál férfiakban a fokozott aromatazaktivitás általi ösztrogénszint emelkedés és csökkent tesztoszteronszint következtében gynecomastia, potenciazavar kialakulásával számolhatunk. Nőkben az androgének arányának növekedésével hirsutismus, hajhullás, secunder amenorrhoea és infertilitás alakulhat ki [76-78].

T1DM, illetve manifeszt T2DM esetén a felszaporodó anyagcseretermékek, késői glikációs végtermékek, reaktív oxigéngyökök és konstansan magas cukorkoncentráció hatására az erek falának megvastagodása mellett rugalmasságuk is csökken és az endothelfunkció zavara alakul ki. Ez összességében cukorbetegségekre jellemző kísérintettséget, microangiopathiát okoz. Ez súlyosbítja a nem diabetes specifikus macroangiopathia szövődményeit, amelyben az érlemeszesedés dominál. A microangiopathia hatására a vesében teljes veseelégtelenségig progrediáló, glomeruloscelrosissal járó diabeteses nephropathia alakulhat ki. Emellett vakságot okozó, retinaleválással járó retinopathia és maculopathia alakulhat ki. Az idegek struktúrfehérjéinek glikációjával és mikrocirkulációs zavarával járó diabeteses

neuropathia során a perifériás sensomotoros rendszer mellett akár a vegetatív, vagy különböző szerveket ellátó idegek is sérülhetnek [71, 74, 79].

1.7 Az elhízás és cukorbetegség bőrgyógyászati vonatkozásai

Az elhízás, metabolikus szindróma és T2DM gyakoriságának növekedésével azok bőrgyógyászati szövődményei is gyakoribbá válnak [7]. Már gyermekkortól kezdve magasabb arányú az elhízáshoz társuló bőrbetegségek előfordulása. Ráadásul nem csak definitív obesitas, hanem már túlsúly esetén is megfigyelhető ez a tendencia [6]. Az elhízás következményeként kialakuló inzulin rezisztencia és T2DM bőrgyógyászati szövődményei természetesen átfedést mutatnak az elhízással összefüggésbe hozott betegségekkel. Ha azonban szimplán a cukorbetegséghez kapcsolt bőrbetegségekről beszélünk, ott megjelennek az T1DM-hoz asszociált kórképek is. Az 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben megjelenő bőrproblémák részben szintén átfedést mutatnak [7].

Amikor az elhízás és diabetes bőrbetegségeit említjük, tulajdonképpen nem fogalmazunk pontosan, hiszen ezek háttérben sokszor az egész szervezetet érintő kórélettani folyamatok állnak másodlagos bőrtünetekkel. Továbbá számos bőrbetegség, vagy bőrtünet elhízás nélkül is kialakul, melyek lefolyását azonban az obesitas és diabetes ronthatja. Azt is fontos kiemelni, hogy számos bőrtünet más provokáló hatás esetén is megjelenik, mint például az inzulin rezisztencia bőrtünetei kortikoszteroidok mellékhatásaként [80].

Elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típus diabetes esetén egyrészt a visceralis, ektópiás és subcutan zsírszövet felszaporodását látjuk, mely a proinflammatorikus adipokinek révén gyulladásoz sejtválaszt indukál. Másfelől kezeletlen esetben egy konstansan magas vér és szöveti glükózkoncentrációval számolhatunk. Ezeket tetézik a megváltozott hormonális hatások. Továbbá az érlemeszesedés, szöveti glikáció, micro-, macroangiopathia és neuropathia hatására szöveti oxigén és tápanyag deficit is kíséri a fentieket. Mindezek hatására romlik az epidermis barrier funkciója, csökken a keratinociták és fibroblastok proliferációja, csökken az egészséges kollagén termelése. Lassul a glikált, keresztkötött, csökkent elaszticitású kollagén degradációja. A hám és kötőszöveti milió megváltozása remodelinghez, további vér és nyirokkeringési zavarhoz vezet [6-8, 81-84].

Elhízáshoz kapcsolódó és elhízás során súlyosbodó leggyakoribb bőrbetegségek etiológia szerint csoportosítva az alábbiak [8]:

Inzulinrezisztencia

- acanthosis nigricans
- acrochordon
- keratosis pilaris
- hyperandrogenismus
- hirsutismus

Mechanikus

- plantaris hyperkeratosis
- striák
- cellulit
- adiposis dolorosa
- lymphoedema
- krónikus vénás elégtelenség

Fertőzés

- intertrigo
- candidák
- dermatophytonok
- folliculitis
- nekrotizáló fasciitis
- cellulitis/ erysipelas

Gyulladás

- hidradenitis suppurativa
- psoriasis

Metabolikus

- köszvényes csomók

A hormonális változások és inzulin rezisztencia kialakulása miatt gyakran látjuk a hajlatok és nyak bőrének szürkés elszíneződését (acanthosis nigricans), fibromatoid bőrnövedékek megjelenését (acrochordon), vagy nőknél androgén alopecia, esetleg kóros szőrnövekedés kialakulását (hirsutismus). A mechanikus, és részben hormonális hatások következtében gyakran narancsbőr (cellulit) és striák jelentkeznek. Szintén mechanikai, illetve angiológiai és rheológiai okok miatt gyakoribb a nyirokpangás (lymphoedema) és a vénás visszaáramlás zavara (krónikus vénás elégtelenség). További mechanikai hatásként az ízületi terhelés miatt gyakran a lábfej deformálódását és rajta a bőr megvastagodását észleljük (plantaris hyperkeratosis). Emellett számos gyulladásos bőrbetegség, mint a psoriasis, hidradenitis suppurativa, seborrhoeás-, atopiás ekzema lefolyását rontja az elhízás. Ennek háttérében felmerül a SAT-ból felszabaduló proinflammatorikus adipocytokinek, mint például a TNF-alfa, szerepe is. Említésre méltó továbbá, hogy nem direkt következményként, de egyes kutatások a melanoma és hám eredetű bőrtumorok gyakoribb előfordulását is leírták az elhízás kapcsán [7]. A nagy testfelületek, összefekvő bőrterületek, fokozott izzadás, csökkent barrierfunkció, szöveti oxigenizáció és vérellátás, valamint a magas szöveti cukorkoncentráció kedvez a felületes gombás és bakteriális fertőzések, mint candidiasisok, dermatophyton fertőzések, intertrigo és folliculitisek kialakulásának. A fentiek miatt nagyobb az esélye mélyebb fertőzések, mint orbánc és cellulitis kialakulásának. Diabetes esetén a társuló immundeficientia miatt a végtagot és életet veszélyeztető mély lágyrészinfekciók

(fasciitis necrotisans) vagy osteomyelitis előfordulása is gyakoribb. A helyzetet súlyosítja a sebgyógyulásihajlam jelentős csökkenése, melyet már szimplán obesitas kapcsán is megfigyelhetünk [6-8, 83]. Manifeszt diabetes esetén a fenti szövődmények még súlyosabb lefolyást mutatnak a jelentősebb immundeficientia és neuropathia miatt. A nyomási pontokon kialakuló fekélyek hátterében a trophicus zavarok mellett, a neuropathia is kiemelt jelentőséggel bír. Utóbbi miatt a beteg nem mindig veszi észre a fekély kialakulását, mivel az nem okoz kifejezett fájdalmat. Ilyenkor kialakulhat a diabeteses láb szindróma, mely megjelenését az ischaemiás lábfájdalom, hűvös, sápadt végtag és érzékszavar idejekorán előre vetítik. Az obesitas miatt torzult lábfejen a nyomási pontok felett kialakuló, sokszor terápiarezisztens fekélyt *malum perforans pedis*nek nevezzük. Ez a nehézkes gyógyulást követően is gyakran recidivál és bizonyos esetekben amputációhoz vezető fertőzések kiindulópontja lehet [85]. A diabetesben a sebgyógyulási zavar és terápiarezisztens végtagi fekélyek tekinthetők a legsúlyosabb bőrgyógyászati szövődményeknek, ugyanakkor emellett számos további bőrelváltozás van, melyek a betegséget kísérik, vagy előre jelzik [86]. Az elhízással kapcsolatban leírt elváltozások általában a T2DM-ra is jellemzőek, mivel annak a kiindulási állapota az obesitas. A fentiek közül az inzulin rezisztenciához kapcsolódó tünetek, illetve a sebgyógyulászavar és infektív szövődmények a leggyakoribbak. Ezen kívül egyéb jellemző tünetek még a lábszárakon erythemás, barnás foltok (*dermopathia diabetorum*), vagy erysipelasszerű erythema megjelenése melyek angiopathiára utalnak. Kavicszerű (*pebble like*) ujjak is kialakulhatnak a bőr megvastagodásával, de a sclerodermiform tünetek a hát felső részén is jelentkezhettek (*scleroedema adultorum*). Ezek mellett előfordulhat még a bőr és köröm sárgás elszíneződése, továbbá viszkető csomók megjelenése is (*prurigo diabetorum*). Vannak továbbá olyan jelenségek is, melyek direkt összefüggését a diabétessel még nem sikerült bizonyítani, de előfordulásuk cukorbetegség esetén gyakoribb. Ilyenek a disszeminált *granuloma annulare*, *dyslipidemiák* és *eruptív xanthoma* [86].

Ezzel szemben T1DM esetében, mivel ahhoz nem feltétlenül társul obesitas, más jellegű tünetek dominálnak. Mivel a T1DM hátterében az autoimmunitás dominál, így a bőrtünetek között is megjelennek az autimmunitással összefüggésbe hozhatóak, mint például az *alopecia areata*, *vitiligo*, *hypothyreosis* és *lichen ruber planus*.

A diabeteshez kapcsolódó bőrtünetek a cukorbetegség típusa szerint csoportosítva [87]:

T1DM

- periungualis teleangiectasiák
- necrobiosis lipoidica
- bullosis diabetorum
- vitiligo
- lichen ruber planus

T2DM

- acanthosis nigricans
 - acrochordon
 - sárga köröm és bőr
 - bőr megvastagodás
 - diabeteses dermopathia
 - calciphylaxis
 - eruptiv xanthoma
 - granuloma annulare
- + Infekció: felületes és mély gombás, bakteriális fertőzések mellett ritka fertőzések.

Természetesen rosszul beállított terápia, vagy non-compliance mellett a tartósan magas vércukorérékek hatására a micro-, macroangiopathia, neuropathia és immundeficientia itt is kialakulhat. Ennek megfelelően az ér érintettség tüneteként megjelenhetnek a periungualis teleangiectasiák és az arc erythemája (rubeosis diabetorum). További jellemző bőrtünetek lehetnek még a lábszárak feszítő felszínén megjelenő sárgás, atrophias plakkok (necrobiosis lipoidica), melyek háttérében ér és kötőszöveti károsodások állhatnak, valamint a lábszárakon, lábujjakon megjelenő feszes hólyagok (bullosis diabetorum). Utóbbit neuropathia kapcsán figyelték meg gyakrabban [86].

Infekciók tekintetében az immunstátusz a döntő, de az erek és idegek állapota, továbbá a lokális viszonyok és személyes higiéne is kiemelt jelentőséggel bír. A felületes gombás és bakteriális fertőzések mellett gyakrabban látunk mély lágyrészinfekciót, illetve diabeteses lábat, melyeket a fentiekben részleteztem. A terápiaerezisztens fertőzések mellett megjelenhetnek a ritka fertőzések is, mint Phycomycetes-ek által okozott mucormycosis, Clostridiumok által okozott anaerob cellulitisek, vagy a súlyos Pseudomonas fertőzések [85-89].

1.8 Újgenerációs képalkotási eljárások a bőrgyógyászatban

A bőrgyógyászati vizsgálat során szerencsés helyzetben van a szakorvos, mivel a bőrbetegségek nem csak szubjektív, a beteg által panaszolt, tünetek alapján, hanem objektíven, a bőrtünetek inspekciójával is megítélhetőek. Sok betegség esetében igen jellegzetes bőrelváltozással találkozhatunk, mely lehetővé teszi a klinikai diagnosztizálást. Ugyanakkor a „blikk” diagnózisokon túl számos esetben találkozunk kevésbé specifikus bőrtünettel, melyek esetében a differenciáldiagnózis sokszor nehézkes. Ezen felül szembe találhatjuk magunkat olyan akadályokkal is, amikor ugyan klinikailag könnyen felállítható a kórisme, de a további kezelés megtervezéséhez az alapdiagnózis, illetve bőrtünet további karakterizálásra szorul.

Korábban a fent említettekre egyedül a rutin szövettani vizsgálat adott lehetőséget, melyet később az optikai eszközök fejlődésével a dermatoscopos (DS), majd az ultrahang (UH) vizsgálat egészített ki. A dermatoscopia során egy megvilágított objektívval rendelkező kézi eszköz segítségével immerziós közeg használatával 10-szeres nagyításban vizsgálhatjuk a bőrfelszín elváltozásait. Ez gyakorlatilag egy kissenagyítású epilumineszcens kézi mikroszkóp, mely a hám felületén és a dermis felső részén jelentkező bőrtünetek differenciálását teszi lehetővé. Az újabb eszközök LED fényforrással és polarizált lencsével vannak ellátva, ami ez előző generációs dermatoscopokhoz képest szignifikánsan megnövelte a diagnosztikai pontosságot. A polarizált lencsének köszönhetően a felhámon keletkező szórt fény zavaró hatása immerziós közeg nélkül is kiküszöbölhető, a többszínű LED-ek pedig a pigmentált elváltozásokat helyezik más megvilágításba. Az eszköz kvalitásai alapján leggyakrabban a benignus és malignus bőrtumorok, utóbbiak esetében pedig a melanoma és non-melanoma bőrrákok elkülönítésére használják. Ezen felül azonban többek közt vizsgálható vele a hajas fejbőrön a hajszálak sűrűsége és szerkezete, a periungális régió kapillárisai, a körömlemez elváltozásai, rovarcsípés gyanúja esetén a szűr csatornák jelenléte és scabies esetében a rühatka bőrbe vájt járatai. Legnagyobb klinikai jelentősége természetesen a melanoma malignum diagnosztizálásában és az altípus meghatározásában van. Többféle score rendszer létezik a malignitás meghatározására, melyet az orvos a látott kép alapján alkalmazhat [90]. Emellett ma már vannak számítógéppel összekötött, vagy mobiltelefonra applikálható digitális dermatoscopok is, melyek már a vizsgálat során képeket rögzítenek, amiket egy szoftveres algoritmus

értékel. Ezen felül lehetőséget ad a teledermatológiára is, amikor az átküldött képeket egy expert vizsgáló is értékeli. A dermatoscopos vizsgálat hátránya azonban, hogy a diagnosztikus érzékenysége nem 100%-os és nagyban függ a vizsgáló jártasságától. Emellett az eltérések mélységi terjedéséről nem ad információt, mely pl. melanoma esetében kiemelt jelentőségű lenne, akár már a műtét tervezésénél a biztonsági szegély meghatározásához is [91].

A bőrelváltozás mélységi megítélésére elsőként az ultrahangos vizsgálat adott lehetőséget. Ilyenkor magas frekvenciájú, az emberi fül számára hallhatatlan, szélessávú hanghullámok segítségével vizsgálódunk, melyek különböző mértékben verődnek vissza a vizsgált szövetekről és szövetközi határfelületekről. A módszer leginkább az üreges és parenchimás szervek vizsgálatára alkalmazható, de a technika fejlődésével a 20Mhz-es nagy teljesítményű lineáris transducerek segítségével már sok bőrelváltozás mélysége és minősége is megítélhető [92]. Vizsgálhatjuk az elváltozás keménységét elasztográfiás technikával, továbbá mikro- és makrocirkulációját fine flow és Doppler módszerekkel. Melanoma műtéti eltávolítása előtt ezzel a technológiával már jobban megítélhető a szükséges biztonsági szegély nagysága. Ugyanakkor az UH-os technika hátránya a viszonylag alacsony felbontás, mellyel a daganat széli részeinek 100%-os elkülönítése az ép szövetből nem lehetséges. Emellett a daganat, vagy bőrelváltozás tipizálása, besorolása sem lehetséges [92]. Előnye azonban, hogy a bőrön keresztül mélyebben fekvő struktúrák, mint a zsírszövet és izomszövet is látható. Ennek ellenére is azonban inkább csak a klinikai, vagy dermatoscopos, diagnózis után további tájékozódó vizsgálatokra és utánkövetésre alkalmas [92]. Az utóbbi időben a szofisztikált képalkotó eljárások elterjedésével megnőtt az igény a viszonylagosan kellemetlen és bizonyos szempontból kockázatos is rejtő biopsziák számának csökkentésére. Erre adhatnak lehetőséget a következőkben felsorolt újgenerációs *in vivo* képalkotási módszerek. Az optikai tudományok fejlődésével az utóbbi évtizedekben több olyan képalkotási eljárást is kifejlesztettek melyek a fent említett hiányosságok kiküszöbölésére alkalmasak. A legnagyobb áttörést a lézerek megjelenése hozta, mely a felbontóképesség megsokszorozódását tette lehetővé [91].

1.8.1 Optikai koherencia tomográfia

Az UH vizsgálathoz hasonlóan keresztmetszeti képet ad az OCT is, mely általában lézer alapú megvilágítást használ. A szövetről visszaverődő lézerfényt egy referencia útvonalról visszaérkező fénnel együtt észleli a detektor, melyet követően azok interferenciája teszi lehetővé az optikai leképzést. A szemészetben már alapvizsgálatnak számít a cornea és retina elváltozások diagnosztizálására [93], de az utóbbi években a bőrgyógyászatban is megjelent [94]. Az UH-hoz képest lényegesen nagyobb, akár 3 μ m-es felbontást is elér, azonban a leképzett terület és mélység kisebb. OCT-vel a dermis egy része hozható látótérbe, körülbelül 2 mm-es mélységig, de ez nem okoz különösebb problémát, mivel a legtöbb vizsgálni kívánt bőrelváltozás nem terjed ennél mélyebbre [94]. Az egyik saját vizsgálatunk során UVB besugárzás után mértük meg sikeresen különböző genetikai háttérrel rendelkező egerek epidermis vastagságát [95]. Irodalmi adatok alapján vizsgálható vele az epidermis vastagsága gyulladásos bőrbetegségek esetén, a haj és szőrszálak szerkezete, továbbá autoimmun hólyagos bőrbetegségek karakterisztikájára is alkalmas [94, 96]. A dinamikus, egymás utáni scan-ek különbségeit összehasonlító berendezés (D-OCT) alkalmas a véráramlás követésére, például kötőszöveti betegségek, érmalformációk és tumorszövetek esetén [97, 98]. Polarizációs szenzitív (PS-OCT) technikával az extracelluláris kötőszövet vizsgálható a dermis kettős törésének változásának elemzésével. Ennek fibrosissal járó betegségek, vagy photoaging diagnosztizálásában lehet jelentősége [99]. A nagyfelbontású (HD-OCT) készülékek megjelenése növelte a diagnosztikai pontosságot. Emellett a berendezések horizontális metszetek felvételére és 3D képrekonstrukcióra is alkalmassá váltak, melynek legnagyobb előnyét a bőrtumороk vizsgálatánál tapasztalták [92]. Meghatározhatóvá váltak a hám eredetű, valamint pigmentált jó- és rosszindulatú bőrfolyamatok OCT jellemzői, melyek alapján a szövettani vizsgálat eredményeihez közelítő adatokat kaptak. 104 beteg non melanoma bőrtumorát vizsgálva a módszer szenzitivitása 79%–94%, míg a specificitása 85%–96% között mozgott az egészséges bőr és a különböző elváltozások megkülönböztetésére nézve. A basalioma elkülönítése az aktinikus keratosisól azonban 50%–52% -os hibaarányt mutatott [94]. Egy másik vizsgálat szerint 25 szövettannal igazolt és altípusba besorolt BCC esetében HD-OCT-vel nem volt elkülöníthető a szuperficiális és a noduláris basalioma [92]. További tanulmányok szerint a műtét előtti OCT vizsgálattal túlbecsülik a mélységi terjedést, vélhetőleg a tumorszövet körüli

gyulladásos infiltrátum miatt. A sebészi szélek meghatározásánál ígéretesebb eredmények születtek. Mohs szerinti műtéteknél, amikor a műtéti asztal mellett azonnali szövettani vizsgálat történik fagyasztott metszeteken, a műtét előtti *in vivo* OCT technikával csökkenthetővé válhat a kimetszendő „szeletek” száma. Ugyanakkor összehasonlítva az *ex vivo* végzett OCT vizsgálat eredményeit a konvencionális fagyasztott metszeteken végzett szövettani vizsgálattal, a szenzitivitása csak 19%, a specificitása pedig 56%-volt [94]. Melanociter elváltozások vizsgálatánál a tumormélység megítélésében a szövettani vizsgálattal egyező eredményeket kaptak, de 1mm-nél vastagabb léziók esetében az OCT nem alkalmas pontos vizsgálatra. Egy további összehasonlító vizsgálatban a malignus és benignus melanociter elváltozások elkülönítésénél a szenzitivitás csak 74,1%, a specificitás 92,4%-volt [94].

1.8.2 Reflektancia konfokális mikroszkópia

Az OCT mellett a bőrgyógyászati klinikai gyakorlatban jelenleg az RCM a másik, viszonylag szélesebb körben elterjedt, *in vivo* alkalmazható képalkotó eljárás. Bár a felhasználási köre korlátozott és a berendezés beszerzése, üzemeltetése költségigényes, mégis előrejelzi jövőbeni elterjedését és jelentőségét, hogy már gyakorlati képzés keretei közt találkozhatunk vele szakmai konferenciákon. Itt is egy lézer gondoskodik a minta megvilágításról. Ez jellemzően alacsony 22 mW teljesítménnyel működik 830 nm körüli hullámhosszon, így egészségügyi kockázatokat nem rejt magában. Az immerziós objektívet magába foglaló vizsgálófejet a bőrhöz kell érinteni megfelelő kontaktmédiumot alkalmazása mellett. Az objektív által fókuszált visszaérkező lézernyaláb egy részét sugárelosztó irányítja a detektor felé. Az optikai információt tartalmazó nyaláb egy lyukdiafragmán (pinhole aperture) keresztül jut a detektorba [100]. Itt kerülnek leképzésre a magas, 0.5–1.0 μm -es, felbontást mutató képek. Az OCT-vel ellentétben itt nem keresztmetszeti, hanem horizontális *en face* metszeteket kapunk, a metszetenkénti horizontális felbontása hozzávetőlegesen 3–5 μm . Az elkészült képek 500- μm -es látótérrel biztosítanak hozzávetőlegesen 30-szoros nagyítás mellett. A vizsgált terület növelhető gyors, 2D pásztázással, mely után a mozaik elrendezésben összeillesztett képek 8x8 mm^2 –es területek leképezését teszik lehetővé. A maximális vizsgálati mélység 350 μm körül van, tehát maximum a papilláris dermis elérésére

alkalmas. Az eddigi vizsgálatok során ez általában nem jelentett hátrányt, mivel a dermo-epidermális junkció körüli eltérések voltak fókuszban. A képalkotás során az endogén fényvisszaverő, azaz reflektív sejtalkotók és molekulák szürkeárnyalatos leképzése észlelése történik. Ilyenek például a melanin, melanoszómák, keratin és kollagén. Ez bizonyos értelemben véve korlátozottságot is jelent, mivel a melanin tartalomtól függően másként vizsgálhatók a sötétebb és világosabb bőrű páciensek bőrelváltozásai. További hátrány, hogy a módszer nem alkalmas vertikális metszetek megjelenítésére, így az *en face* képeken a mélységi penetráció megítélése nehézkes, ráadásul a dermis felső rétege után korlátozott. Emellett némi zajt okozhat a képen a gömb alakú sejtmembránokról visszaverődő fény, vagy a kontaktmédiumba kerülő szennyeződések [100]. Mivel az eljárás azonban fájdalomtalan és gyors, körülbelül 30 perc alatt elvégezhető, betegágy melletti képalkotást tesz lehetővé, a klinikai gyakorlatban hasznos eljárás lehet [101].

A klinikai felhasználása során a melanociter elváltozások diagnosztikájában az RCM magasabb felbontóképessége révén egyértelműen felülmúlta az OCT-t a magasabb felbontóképessége révén. Bizonytalan dignitású melanociter elváltozások vizsgálatánál szenzitivitása 91%, specificitása 68% volt. Ez elsőre nem tűnhet túl meggyőzőnek, de ugyanebben az összehasonlításban a dermatoscopos vizsgálat 88% és 32%-os eredményt ért el [102]. Egy 3108 beteg adatait vizsgáló metaanalízis szerint az összes típusú bőrrákra nézve átlagos szenzitivitás 94%, a specificitás pedig 83% volt. Melanomák esetében az átlagos szenzitivitás 93%, a specificitás 78%, míg basaliomák esetében ezek az értékek 92% és 91% voltak [90]. Ezek mellett sikeresen alkalmazták amelanotikus és ajak melanomák vizsgálatára és szegélymeghatározására is [90, 103, 104]. Korábbi tanulmányok szerint a benignus melanociter elváltozások, illetve a klinikailag basaliomára gyanús elváltozások kimetszése 50-68%-al csökkenthető volt RCM vizsgálatot követően. Ugyanezekben a felmérésekben a basalioma diagnosztikájának a specificitása 100%-os volt. A műtét előtti punch biopszia, vagy RCM vizsgálat eredményeit összehasonlítva nem találtak szignifikáns különbséget a diagnosztikai pontosságban, ráadásul RCM estén a vizsgálat azonnal értékelhető és nem kell várni az eredményre [105, 106]. Emellett sikeresen alkalmazható Mohs féle kimetszés során a műtét előtti *in vivo*, illetve a műtét közbeni *ex vivo* vizsgálatokkor is, mellyel csökkenhet a beavatkozás ideje, illetve kimetszések száma is. Továbbá a basaliomák lokális kezelésének követésére is alkalmas [90, 103, 107]. A bőrdaganatokon kívül autoimmun,

allergiás, illetve gyulladásos bőrbetegségek leírásával, követésével és az alkalmazott terápia hatékonyságának követésével kapcsolatban is gyűlnek már az adatok [108-111].

1.8.3 Nemlineáris mikroszkópia

A két-, illetve multifoton abszorpció excitációs fluoreszcencia (TPEF) mikroszkópia [21], másodharmonikus keltés (SHG) [24], illetve koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS) [112] olyan nemlineáris képalkotási módszerek, melyek során a tanulmányozott szövetek nem igényelnek fluoreszcens festést, mivel maguk a vizsgálni kívánt molekulák gerjesztése hoz létre detektálható jelet. Ennek köszönhetően számos molekula szolgál a bőrben endogén kromofórként, így lehetővé téve bizonyos szövetek *in vivo*, jelölés nélküli leképését [113].

Chromophore	Excitation λ_{ex} (nm)	Emission λ (nm)
Fluorescence and SHG		
Retinol (20)	700–830	450
NADH (17,97–100)	340; 690–730	450–470
Vitamin D (20)	< 700	450
Flavins (17)	370, 350; 700–730	430
Melanin (101)	280–450	440, 520, 575
Elastin (101)	300–340; 700–740	420–460
Collagen		
Fluorescence	300–340; 700–740	420–460
SHG (19,101)	720–960 (tunable range of TP laser)	360–480 ($\lambda_{\text{ex}}/2$)
CARS	Excitation	Emission ω (cm^{-1})
C-H stretch	See (23,29)	2845 cm^{-1}
Sebaceous glands		2845 cm^{-1}
Adipocytes		2956 cm^{-1}

4. ábra Nemlineáris mikroszkópia során detektálható endogén kromofórok [113].

További előnye a nemlineáris mikroszkópiának, hogy a képalkotás során nagy térbeli és időbeli felbontást érhetünk el. Ennek köszönhetően pár mikron méretű sejtalkotók is vizualizálhatóak és az időbeli felbontásnak köszönhetően bizonyos élettani folyamatok akár élőben, *in vivo* követhetőek. TPEF és SHG képalkotás során általában egy hangolható hullámhosszú, módusszinkronizált lézerfényforrást használnak. A módusszinkronizáció az impulzus üzemet biztosítja, mely során a lézerforrás nem „világít” konstansan, hanem piko-, vagy femtoszekundumnyi impulzusok formájában adja le az energiát. Ez többek közt biztonságtechnikai szempontból is előnyt jelent, mivel

csökken a termikus károsodás lehetősége. Ezzel szemben CARS képalkotás során két különböző frekvenciájú, egy pumpa és egy Stokes, lézersugár felelős a minta megvilágításáért. Amikor a két nyaláb közötti frekvenciakülönbséget úgy hangolják, hogy a vizsgált minta molekuláris rezgésfrekvenciájának megfelelően, akkor nemlineáris kölcsönhatásként anti-Stokes frekvencián detektálható jel keletkezik a CARS folyamat révén. Az egy hullámhosszon történő nemlineáris mikroszkópia során általában egy hangolható, femtoszekundumos titán- zafír (Ti:S) lézert használnak [114]. Az utóbbi években azonban a lézertechnika fejlődésének köszönhetően megjelentek a nemlineáris mikroszkópiára alkalmas femtoszekundumos impulzusüzemet biztosítani tudó száloptikás lézer oszcillátorok és erősítők is [115, 116]. 2009-ben mutatták be Pegoraro és mtsai. az első száloptikás technikán alapuló TPEF, SHG és CARS képalkotására egyaránt alkalmas kombinált mikroszkóprendszert [117]. A száloptikás technika nagy előnye, hogy a korábban asztalhoz rögzített bonyolult tükör és lencserendszerek helyett hajlékony optikai szálakon keresztül is vezethető a lézernyaláb és a visszaérkező optikai információ, mely lehetővé teszi akár az endoscopos jellegű felhasználást is [118]. A nemlineáris mikroszkópia széles körben elterjedt és számos felhasználási területe létezik. A medicinában az idegtudományok és kardiológia területein is előszeretettel alkalmazzák a kutatások során [119, 120].

Jelenleg többféle, TPEF képalkotásra alkalmas, hangolható Ti:S lézerral működő mikroszkópos rendszer létezik. Ezeket, a ma elérhető technológiával, már költséghatékonyan át lehet alakítani CARS mérésekre is alkalmas berendezésekké. Az első klinikai felhasználásra és bőrgyógyászati diagnosztikára alkalmas berendezést MPT Flex néven Karsten König munkacsoportja alkotta meg [121-123]. Az OCT és RCM-hez képest több előnye van a rendszernek. Egyrészt nagyobb felbontásra képes és nagyobb a mélységi penetrációja, mivel a dermis mélyebb rétegei, egészen a subcutisig látótérbe hozhatók. Többféle endogén kromofór alkalmazható *in vivo* képalkotásra, így az egyesített képeken több színben láthatjuk a különböző struktúrákat a szürkeárnyalatos kép helyett, akár 3 dimenzióban. Ugyanakkor keresztmetszeti képet ez sem ad, és a leképzett terület nagysága sem nagyobb. A képalkotás során itt is találkozhatunk a zaj jelenségével, melyet például felhalmozódó metabolikus termékek okoznak. Továbbá bizonyos esetben a jel erőssége, vagy a kontraszt nem elégséges a megfelelően értékelhető kép elkészítéséhez. Legnagyobb hátránya azonban a bekerülési és fenntartási

költségekben keresendő. A kombinált lézerrendszerek miatt ez jóval meghaladja az RCM költségeit, míg jelenleg diagnosztikai kvalitásaiban nem múlja felül azt. Mivel a berendezés beszerzése, gazdasági értelemben véve valószínűleg nem térül meg, így emiatt egyelőre olyan centrumokban érdemes fenntartani ahol a diagnosztika mellett a kutatásban is ki tudják aknázni a lehetőségeit [103].

A bőrgyógyászati alapkutatások során több területen alkalmazták előremutató vizsgálatokban. Többek közt a bőr kötőszöveti átépülését vizsgálták betegségek, öregedés vagy photoaging során [124-127], továbbá gyógyszerek és kozmetikumok felszívódását is vizsgálták a módszerrel [128-130]. Kutatásokban, melyekben munkacsoportunk is részt vett, transzgenikus egerek bőr barrier funkcióját, illetve nanopartikulumok penetrációját vizsgáltuk nemlineáris mikroszkópiával [25, 26].

Mivel a nemlineáris mikroszkópia jelenleg inkább az alapkutatásban kap nagyobb hangsúlyt, a klinikai tapasztalatok is szerényebbek. Alacsonyabb betegszámú kutatásokban a basalioma diagnosztikájában jó eredményt ért el, mivel átlagos szenzitivitása 84.85 %, specificitása pedig 100% volt [131]. A basaliomák mellett spinalioma és aktinikus keratosis diagnosztikájára és elkülönítésére is alkalmas [128, 132]. Melanociter elváltozások vizsgálatokor a malignitás megítélésékor 71–76% körüli szenzitivitást és 72-97%-os specificitást mutatott. *In vivo* melanoma diagnosztikájában, 115 beteg adatait elemezve, szintén jó eredményt ért el, mivel átlagos szenzitivitása 95% és specificitása 97% volt [103, 129, 133]. A daganatokon kívül számos egyéb bőrbetegség vizsgálatát és nemlineáris mikroszkópiai jellemzőit írták le, például psoriasis, atopiás és seborrhoeás dermatitis, autoimmun hólyagos bőrbetegségek és kötőszöveti átépüléssel járó betegségek esetén [129, 130].

2. Célkitűzések

Az elhízás, metabolikus szindróma és diabetes incidenciájának növekedésével egyre gyakrabban találkozunk ezek súlyos, olykor terápiarezisztens és az életminőséget nagymértékben rontó következményeivel. Háttérükben a bőr kötőszövetének átépülése és károsodása kiemelt szerepet játszik. Kutatócsoportunk, egy konzorciumi projekt keretében, egy *in vivo* képalkotásra is alkalmas, TPEF, SHG és CARS technikákat alkalmazó berendezés segítségével az elhízás és a testmozgás általi súlycsökkenés bőr kötőszöveire gyakorolt hatásait vizsgálta különböző egérmodelleken.

A kísérletsorozat első hosszú távú vizsgálatában (**I.**) *ad libitum* táplált és kalóriamegszorításon tarott leptin deficiens ob/ob egerek, valamint C57BL/6 kontrolegerek kollagénszerkezetét és zsírsejtjeit követtük, illetve vizsgáltuk *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS mérésekkel. Célunk az elhízó egerek bőrében lezajló szerkezeti változások azonosítása és leírása volt, a képalkotó rendszer tökéletesítése és hangolása mellett, mely lehetővé tette az észlelt eltérések *in vivo* követését [30].

A második hosszú távú kísérlet (**II.**) során magas zsír-, magas zsír és fruktóz-, magas fruktóz- és standard kalória tartalmú *ad libitum* diétákon tartott vad típusú C57BL/6 egerek kollagénszerkezetét és zsírsejtjeit vizsgáltuk és követtük *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS technikával. Célunk az elhízás és szöveti glikáció indukálásával kialakuló kollagénszerkezet és zsírsejtméret változások azonosítása, követése és leírása volt. A kísérlet további célja az általunk használt, potenciálisan *in vivo* bőrgyógyászati diagnosztikára is alkalmas, képalkotó technika előnyeinek bemutatása volt [31].

A harmadik hosszú távú vizsgálat (**III.**) során már definitív obesitasban szenvedő, magas zsírtartalmú takarmánnyal táplált, továbbá átlagos testsúllyal rendelkező, standard kalória tartalmú diétán tarott vad típusú C57BL/6 egereket vizsgáltunk. Az azonos korú és nemű, de különböző tápokkal etetett egércsoportoknál 8 hetes önkéntes testmozgást vezetünk be. Célunk a bőr kollagénszerkezetének vizsgálata és követése volt a 8 hetes testmozgással töltött időszak előtt és után. Azt feltételeztük, hogy a sport és súlycsökkenés a dermis kötőszöveti állaptának javulásához vezet, melyet *in vivo* SHG technikával és rutin szövettani vizsgálattal kívántunk bizonyítani [32].

3. Módszerek

3.1 Egér modell és alkalmazott diéták

A kísérletek során az obesitas, illetve a testsúlyvesztés bőr kötőszövetekre gyakorolt hatásaira voltunk kíváncsiak. Emiatt kétféle egértörzsből származó állatokat alkalmaztunk, egyrészt hízásra genetikailag hajlamos B6.Cg-Lep ob/J egereket, másrészt megfelelő diétával hízásra fogható C57BL/6 –egereket. A felhasznált egereket a Charles River’s laboratórium olaszországi és németországi telephelyeiről származtattuk.

A B6.Cg-Lep ob/J vagy B6.V-Lep ob/ob egerekre gyakran csak *ob/ob* egerekként hivatkoznak. Ezek az egerek az *ob* gén egy spontán kialakuló mutációjára nézve homozigóták. Mint azt már az elméleti háttér során említettem, ez a leptin-t kódoló gén. A zsírszövet által termelt leptin egerekben a központi idegrendszeri szabályozáson keresztül nagymértékben felelős az étvágy szabályozásáért. Az *ob/ob* egerek leptin hiányában hiperfággá válnak, kontrollálatlanul esznek, elhízottá, hyperglycaemiássá válnak, glükóz intolerancia alakul ki náluk és megemelkedik a plazma inzulinszintjük. Ezek mellett alpanyagcseréjük alacsony, termékenységük csökken, és endokrin zavarokkal küzdenek, mivel az agyalapi mirigyük és mellékveséjük által termelt hormonjaik szintje is nő. A fentiek miatt előszeretettel alkalmazzák az obesitas és T2DM állatmodelljeiként [134]. Az *ob/ob* egerek mellett kontrollként legtöbbször C57BL/6J (www.jax.org/strain/000664) egereket alkalmaznak. Ez összességében véve a tudományos kísérletekben leggyakrabban alkalmazott beltenyésztett egértörzs. Erre alkalmassá teszi őket, hogy könnyen szaporíthatók, hosszú életűek, alacsony a spontán tumor kialakulásának veszélye és könnyen felhasználhatók genetikailag módosított törzsek létrehozásához. További előnyük, melyet kísérleteink során is kihasználtunk, hogy megfelelően magas zsírtartalmú diétával könnyen elhízás váltható ki bennük. A kifejlett 20 hetes nőstény állatok átlagos testsúlya 23,6 gramm, melyet könnyűszerrel megdupláznak a megfelelő diéta hatására. Az obesitas mellett a T2DM és atherosclerosis kialakulására is fogékonyak [135].

A kísérleti állatokat professzionális állatházban tartottuk standardizált körülmények között. A levegő hőmérséklete 22 °C-volt 50%-os páratartalom és rendszeres légcseré mellett. A megvilágítás 12 órás fény/ sötétség ciklusokra volt beállítva.

I. kísérlet:

Első kísérletünkben három egércsoportot hasonlítottunk össze. Az első két csoportba két-két darab leptin deficiens (*ob/ob*) nyolc-hetes nőstény egeret osztottunk be. A két csoport esetében különböző diétákat alkalmazunk harminc héten keresztül. Az első *ob/ob* csoportot standard pellet formájú állattáppal (SSNIFF, Németország) etettük (*ob/ob* ND – normal diet) és *ad libitum* korlátlan hozzáférést biztosítottunk az ételhez és vízhez. A második *ob/ob* csoport esetében Harrison és mtsai. szerinti kalória megszorítást alkalmaztunk (*ob/ob* CRD - calorie restricted diet) [136]. Ezeknek az egereknek korlátlan hozzáférésük volt a vízhez, de csak napi egy darab 2 grammos táp pellet áll rendelkezésükre a standard laboratóriumi rágcsáló táppból a hét első öt napján. A hét hatodik napján dupla adagot, míg a hetedik napon egyáltalán nem kaptak tápot. A harmadik csoportban kettő darab C57BL/6 egér kontrollként szolgált. Számukra korlátlan víz és táphozzáférést biztosítottunk. Az egerek testtömegét a vizsgálati időszak alatt hetente regisztráltuk egy kalibrált mérleg segítségével.

II. kísérlet:

Második kísérletünket hat-hetes nőstény C57BL/6 egereken kezdtük. Az egereket négy csoportba osztottuk. Mindegyik csoportba öt darab egér került. Mindegyik csoportnak *ad libitum*, korlátlan hozzáférése volt az egerétápokhoz, illetve a vízhez a 32 hetes kísérleti időszak alatt. Az első csoportban (HFat- *high fat*) az obesitas indukálása volt a célunk, ezért magas, 30% zsírtartalmú tápot kaptak (SSNIFF) [137-139]. A második csoport (HFru- *high fructose*) esetében a magas vércukorszint elérése volt a célunk ezért, irodalmi adatok alapján, 20% fruktóz tartalmú vizet kaptak az egyszerű ivóvíz helyett [140, 141]. A harmadik csoportban (HFHF- *high fat – high fructose*) az egészségtelen nyugati típusú étkezés modellezésére magas zsír és szénhidrát tartalmú diétát alkalmaztunk. Ebben az esetben az egerek a magas zsírtartalmú táp mellé cukros vizet kaptak. A negyedik csoport (control) kontrollként szolgált. Standard rágcsálótakarmányt és ivóvizet kaptak a teljes kísérleti időszak alatt. Az egerek testtömegét a vizsgálati időszak alatt hetente regisztráltuk egy kalibrált mérleg segítségével.

III. kísérlet:

Harmadik kísérletünkhöz hat-hetes nőtény C57BL/6 egereket rendeltünk. Nyolc hetes korukban az egereket két csoportba osztottuk, mely során mindegyik csoportba öt egér került. A csoportoknak *ad libitum*, korlátlan hozzáférése volt az egértápokhoz, illetve a vízhez a 40 hetes kísérleti időszak alatt. Az első csoportba (HF- *high fat*) öt egér került. Itt az obesitas indukálása volt a célunk, ezért magas, 30% zsírtartalmú tápot (SSNIFF) és normál ivóvizet kaptak. A második csoportban (CO-control) négy egér kontrollként szolgált. Az egerek standard, 10% zsírtartalmú rágcsáló takarmányt (SSNIFF) kaptak normál ivóvíz mellett.

3.2 Önkéntes testmozgás bevezetése

III. kísérlet:

Harmadik kísérletünk során az *ad libitum* magas zsírtartalmú takarmánnyal táplált egerek esetében obesitas indukálása volt a célunk. Az egerek negyven hetes korukra szignifikánsan nehezebbek lettek a kontrolcsoporthoz képest és elérték a súlygyarapodás platóját. Ekkor a diéta megváltoztatása nélkül 8 héten keresztül napi rendszerességű testmozgást vezettünk be heti két pihenőnap közbeiktatásával. Eszerint hétfőtől péntekig mindkét csoport tagjai számára naponta 40 percig rendelkezésre állt egy távolság és sebességmérővel felszerelt taposómalom. Az adott sportolási időszakra elkülönítettük az egyes egereket, hogy ne alakuljon ki kompetíció a kerék használata közben. Az egerek aktivitását egy jelen levő vizsgáló felügyelte. A fizikai aktivitás önkéntes jellegű volt, mivel nem motorizált taposómalmot használtunk. Ezalatt az időszak alatt semmilyen ösztönző eszközt nem alkalmaztunk a fizikai aktivitás befolyásolására. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy az adott időszakra elkülönített egerek nagyobb teret kapva aktívabbá váltak, a taposómalomban eltöltött időszakot pedig végig futással töltötték. A napi sporttevékenységüket az egerek a nappali időszakban végezték. Minden egér naponta megtett távolságát regisztráltuk. Az egerek testtömegét a vizsgálati időszak alatt hetente mértük egy kalibrált mérleg segítségével.

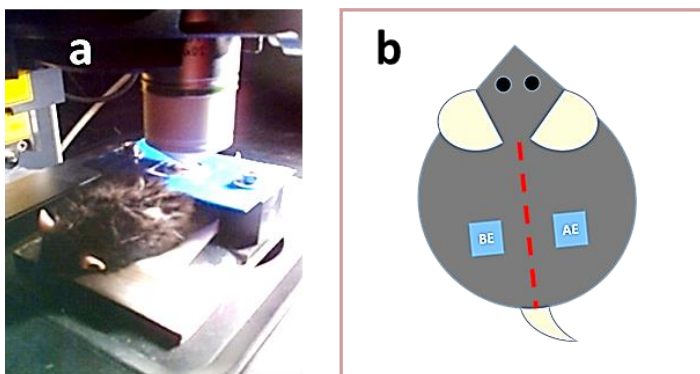
3.3 Nemlineáris mikroszkópia (SHG, CARS)

3.3.1 Képkalkotás

Projektünk során kísérleteinkben a bőrkötőszövet, azon belül is a kollagén, illetve a zsírszövet és adipociták vizsgálatát végeztük SHG és CARS mikroszkópiával.

Az *in vivo* méréseket megelőzően az egerek háti szőrét eltávolítottuk. Irodalmi adatok alapján ez elektromos borotvával történt. A szintén ajánlott szőreltávolító krém használatától eltekintettünk, a rögzített képeken esetlegesen megjelenő nem specifikus jelek kiküszöbölésére [142]. Az állatokon végzett nem invazív beavatkozásokat, mint a szőrtelenítés és *in vivo* nemlineáris mikroszkópiás mérés, altatásban végeztük. Az altatás 1,2%-os tribromoethanol (Avertin, Sigma Aldrich) oldat 0,23 ml/ 10g intraperitoneális injekció beadásával történt. Az elaltatott állatokat egy általunk kialakított speciális rögzítő sínbe helyeztük, mely az elmozdulás megakadályozását szolgálta (5. ábra a.). A rögzítősín a mikroszkóp számítógéppel vezérelt tárgylemeztartójára volt felszerelve, mely lehetővé tette a precíziós léptetést a mérések között. Az egér hátbőrére vizet cseppentettünk, majd egy tárgylemezzel fedtük le, mely a sín pár tetején feküdt. Így a vizsgálni kívánt bőrfelület teljesen síkká vált és kiküszöböltük a légzőmozgások általi elmozdulást. Erre azért volt szükség, mert a vizsgálni kívánt bőrfelület konstans mozgása, vagy egyenetlensége esetén a számítógép vezérelt objektívvel nem tudtuk volna a meghatározott „mélységben” a képet felvenni a mozgási műtermékek miatt. Az egér hátára cseppentett víz a megfelelő töröközeget biztosította a bőr és a tárgylemez között, megelőzve az esetlegesen beszorult levegőzárványok zavaró hatását. A képkalkotás során a tárgylemez tetejére is vizet cseppentettünk, mivel a felvételekhez egy vízimmerziós objektívet használtunk. *In vivo* SHG felvételeket négy alkalommal készítettünk az I. és II. kísérletek során. Az első felvételeket a különböző diéták bevezetését követő 8. héten, majd a többi felvételt a 16., 24., és 30., illetve a II. kísérletben a 32-ik héten készítettük. A III. kísérletben ettől eltérően két alkalommal készült *in vivo* SHG felvétel, először a sport bevezetése előtt (BE- before exercise), majd 8 héttel később a kísérlet lezárásakor (AE- after exercise). Az I-II. kísérletek során az SHG felvételek mindig ugyanazon a bőrfelületen történtek, majd innen az utolsó mérés után 4mm-es punch biopsziát végeztünk. Szövetteni elemzés és összehasonlítás a csoportok között így csak a kísérlet végén történt. Ezzel szemben a III. kísérletben mind a sport bevezetése előtt, mind pedig a kísérlet végén történt SHG mérés után szövetteni mintavételre került sor. Ebben a

kísérletben az egerek hátának jobb és bal oldalán mindkét oldalon a gerinctől 5mm-nyire 6 mm x 6 mm-es vizsgálati területeket (ROI region of interest) jelöltünk ki. A sport bevezetése előtt a bal oldali ROI területén mértük az SHG intenzitást, majd közvetlenül utána 6mm-es punch biopsziát végeztünk. A kísérlet lezárásakor a jobb oldali ROI területén jártunk el ugyanígy (5. ábra b.). Ebben a kísérletben előtte- utána összehasonlítást végeztünk, így nem lehetett azonos területeken mérni, mivel a hegképződés mind az SHG, mind pedig a szövettani vizsgálatot befolyásolta volna. A kollagénszerkezet kvantitatív vizsgálatát az SHG intenzitás alapján végeztük. ImageJ (NIH, USA) szoftver segítségével az SHG jelet integrált optikai denzitássá (IOD) konvertáltuk. Az IOD a bőr normál, keresztkötektől mentes, a glikációtól és degradációtól megkímélt kollagénmennyiségével korrelál, így alkalmas a kollagénszerkezet változásainak követésére. Az adipociták vizsgálatát CARS mikroszkópiával végeztük. A CARS technológia lipidek jelölésmentes képalkotására alkalmas technológia. *In vivo* vizsgálható vele például a keratinociták közötti, a bőr barrierben fontos szerepet játszó epidermális lipidek és sejtkapcsoló struktúrák. Vizsgálatunkban azonban a bőr legalsó rétegének sejtjeire voltunk kíváncsiak, melyek leképzését *in vivo* nem tudtuk elvégezni a mélység miatt. Ahhoz, hogy a subcutan zsírszövetig penetráló, jó minőségű képalkotásra alkalmas lézernyalábot használjunk, akkora energiára lett volna szükség, ami már komoly szövetkárosító hatással bírt volna. Emiatt a CARS méréseket *ex vivo* végeztük az SHG mérések után eltávolított punch biopsziás, teljes vastagságú bőrhengereken. Ezeknél a méréseknél a bőrhengereket az epidermális felszínnel lefelé rögzítettük a mozgatható tárgylemeztartóhoz. Az objektív felé így a subcutan zsírszöveti felszín esett, tehát ebben az esetben „alulról” történt a képalkotás a korábbiaknak megfelelő módon.

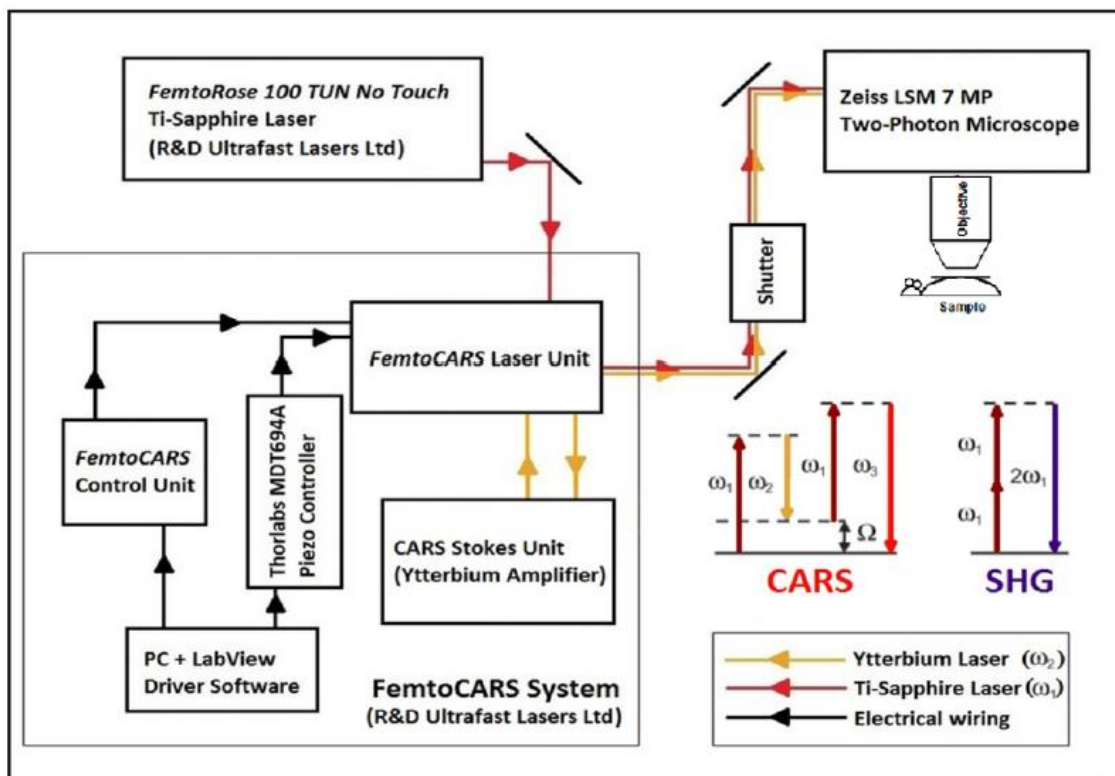


5. ábra: a: Altatott egér a mikroszkóp objektív alatt a rögzítősínben, fedőlemezzel letakarva. b: A testmozgás bevezetése előtti (BE, 0. hét) és utáni (AE, 8. hét) ROI (region of interest)

3.3.2 Technikai leírás

Kísérleteink során az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontjában, Dr. Szipőcs Róbert vezetésével fejlesztett kombináltan 2PAF, SHG és CARS képalkotásra is alkalmas nemlineáris mikroszkópiás berendezést alkalmaztunk. Ez lehetővé tette a vizsgálni kívánt struktúrák jelölésmentes, azaz festés nélküli, *in vivo* SHG és *ex vivo* CARS vizsgálatát egyaránt. Mint azt a bevezetésben is részleteztem, a nemlineáris mikroszkópia során a bőrben található különböző molekulák endogén kromofórként viselkednek a megfelelő hullámhosszon történő gerjesztés esetén. A gerjesztett molekulák magasabb energiaszintre kerülését követően az alacsonyabb energiaszintre történő visszatérésük során detektálható optikai jel keletkezik. A rendszer nem csak a hagyományos mikroszkópos képekhez hasonló kétdimenziós, hanem az egymás alatt különböző mélységekben felvett képek összeillesztésével 3D képalkotást is lehetővé tett. A 3D képeket egy Carl Zeiss Axio Examiner LSM 7 MP pásztázó kétfoton lézermikroszkóp (Carl Zeiss, Németország) segítségével rögzítettük. A lézernyalábok fókuszálását egy 20x-os vízimmerziós objektív végezte (W-Plan – Apochromat 20x/1.0 DIC (UV) VIS-IR, (Carl Zeiss, Németország), amely $0.6 \times 0.6 \text{ mm}^2$ -es területek leképezését tette lehetővé. Ezzel az x és y tengelyeken $\sim 0.5 \text{ }\mu\text{m}$ -es, míg a z tengelyen $1.5 \text{ }\mu\text{m}$ -es térbeli felbontást tudtunk elérni. A 3D képgeneráláshoz szükséges optikai „szeletelést” az objektív z-tengely mentén történő, számítógépesen vezérelt, precíziós mozgatása tette lehetővé. A szeletek egymásra halmozását („z-stack” kép) a Carl Zeiss által fejlesztett ZEN számítógépes szoftver végezte. Az optikai szeletelést *in vivo* SHG képalkotásnál az első kísérletben $5 \text{ }\mu\text{m}$ -enként $60 \text{ }\mu\text{m}$ -es, a második és harmadik kísérlet során $70 \text{ }\mu\text{m}$ -es mélységig végeztük. Az *ex vivo* CARS méréseket az első kísérletben az SHG méréssel azonos beállítással végeztük, a második kísérletben azonban a horizontális felvételek közti intervallum itt $3 \text{ }\mu\text{m}$ volt 5 helyett. Az első kísérlet során 1024×1024 pixeles képfelbontást alkalmaztunk, mely során az egy pixelről történő képalkotás (pixel dwell time) $12.61 \text{ }\mu\text{sec}$ volt. Ezzel az összes szelet felvételének ideje és 3D képpé alakítása nagyjából 10 percet vett igénybe. Mivel minden egérről 5 , de esetenként több felvétel is készült, így minimum 50 percet vett igénybe egy állat vizsgálata. A második és harmadik kísérlet során 512×512 pixeles felbontást és $6,3 \text{ }\mu\text{sec}$ -os pixel dwell time-ot alkalmaztunk, mivel így a képalkotás ideje a felére csökkent. A leképzési terület $0.41 \times 0.41 \text{ mm}^2$ -re módosult, de az értékelhetőségét tekintve a képek minősége szignifikánsan nem romlott.

Tekintettel arra, hogy az SHG felvételek *in vivo*, altatásban történtek a kísérleti állatokat kevésbé terheltük és az altatás szövödményeinek lehetőségét csökkentettük a beállítások megváltoztatásával. A kollagén SHG képalkotásához egy 796 nm-en üzemelő, hangolható, femto- szekundumos Ti:S lézert használtunk (FemtoRose 100TUN NoTouch, R&D Ultrafast Lasers Ltd, Magyarország) (6. ábra). Ez 20 mW-os teljesítmény mellett 190 femtoszekundumos impulzusokat generált 76 MHz-es ismétlési frekvenciával. A kombinált rendszer különlegessége, hogy a FemtoRose lézer egyben az adipociták CARS képalkotásához szükséges pumpáló lézernyaláb feladatát is ellátta. A Stokes impulzusokat egy inherensen szinkronizált, kétlépcsős ytterbium száloptikás (Yb-fiber) erősítő egység (CARS Stokes Unit, R&D Ultrafast Lasers Ltd, Magyarország) generálta 1028 nm-en. Az Yb-erősítő optikai impulzussűrítéséért egy rácspár-kompresszor felelt. A pumpáló és a Stokes nyaláb térbeli átfedését és szinkronizálását, azaz időbeli átfedését, a FemtoCARS Laser Unit (R&D Ultrafast Lasers Ltd, Magyarország) végezte (6. ábra). Az Yb-erősítő teljesítménye 10 mW volt, így a rendszer összteljesítménye 30 mW-körül alakult.



6. ábra: Az SHG / CARS képalkotáshoz használt berendezés főbb egységei [31].

A kollagén SHG és az adipociták CARS jeleit két külön detektor fogadta, melyek közt egy dikromatikus tükör osztotta el a nyalábot (LP555). A jel- zaj arány javításáért sáváteresztő szűrők feleltek, amelyek a kollagén SHG jelének megfelelő ~ 398 nm, illetve az adipociták anti-Stokes jelének megfelelő ~ 649 nm hullámhosszúságú jeleket engedték át. Az utóbbi hullámhossz a telített zsírsavak $-\text{CH}_2$ csoportjainak szimmetrikus vegyértékrezgés rezonanciájának felel meg a mi rendszerünkben.

3.4 Szövetteni vizsgálatok

A szövetteni mintavételekre a korábbi *in vivo* mérésekkel azonos területekről került sor a kísérletek során.

I. –II. kísérlet:

Mivel a fent leírtak szerint a CARS mérések *ex vivo* szövetmintákon történtek, így azt követően a 4 mm átmérőjű körkessel, vagy másnéven punch biopsziás eszközzel eltávolított teljes vastagságú szövethengert 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk. A teljes vastagság ez esetben a bőrre vonatkozik, miszerint az epidermistől lefelé haladva, a zsírszövetet is magába foglalóan, egészen az izom fasciáig terjedt a mintavétel. A szövethengerek ezt követően paraffinba történő beágyazásra kerültek, majd ezekből 4- μm vastagságú metszetek készültek. A metszeteken hematoxylin-eosin, illetve Weigert van Gieson festéseket alkalmaztunk. Utóbbit a kollagén szerkezeti eltéréseinek pontosabb vizsgálatára készítettük. A dermis vastagságát és az adipociták méretét a van Gieson festésű metszeteken elemeztük Digimixer Image Analysis Software (Ostend, Belgium) program segítségével. A dermis vastagságát a subcutan zsírszövet epidermis basalis sejtrétegétől számított távolsággal határoztuk meg. Az első kísérletben a zsírsejtek területét, a második kísérletben pedig a kerületét vetettük össze. Minden egér metszete esetében 2 látótérrel készült digitálisan értékelhető 100x nagyítású fotó. Látóterenként 15 különböző helyen mértük a dermis vastagságát, valamint 20 adipocitát értékeltünk. A diagramokon ezek átlagait és szórásait ábrázoltuk.

III. kísérlet:

A harmadik kísérlet során, ahogy azt a fentiekben részleteztük, a fizikai aktivitás bevezetése előtt a 0. héten, illetve a kísérlet befejezésekor a 8. héten is történt *in vivo* SHG mérés. Eltérően az előző kísérletektől, mind a két mérést követően szövettani mintavételre került sor az *in vivo* méréssel azonos bőrterületekből. Azért, hogy az első mintavétel utáni hegképződés ne befolyásolja a későbbi *in vivo* SHG, illetve szövettani értékeléseket a biopsziákat az előző fejezetben részletezett, külön erre a célra kijelölt 6 × 6 mm-es bőrterületekről (ROI- region of interest) végeztük az egér háti bőrfelszínének jobb és bal oldalairól (5. ábra b.). A szőrtelenítést és mintavételt itt is 1,2%-os Avertinnel történő altatásban végeztük. A mintavétel egy 6 mm átmérőjű punch biopsziás eszközzel történt. Mivel az egerek az első mintavételt követően életben maradtak, a sebeiket Betadine-oldattal kezeltük a *per secundam* sebgyógyulás elősegítésére. Ez jellemzően pár nap alatt bekövetkezett, felülfertőződést, illetve egyéb szövödményt nem észleltünk. Az eltávolított teljes bőrvastagságú szövethengereket 4%-os pufferolt formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A blokkokból 4-µm vastagságú metszetek készültek. Az elkészült metszeteket eltérően az előző kísérletektől nem fényképeztük, hanem egy Panoramic Scanner (3D Histech, Magyarország) segítségével teljes egészében szkenneltük. Ez lehetőséget adott arra, hogy az egész metszetet értékelhessük, mely a korábbiakban használt 100x nagyítással öt látóteret adott ki. A metszeteken kollagén specifikus Weigert van Gieson festést alkalmaztunk. A dermis vastagságát a dermo-epidermális junkció és a dermis- subcutan zsírszövet közötti junkció átlagos távolságával jellemeztük. A subcutan zsírszövet vastagságát ehhez hasonlóan a dermis- subcutan zsírszövet közötti junkció, illetve a panniculus carnosus közötti átlagos távolsággal írtuk le, továbbá meghatároztuk az egyes zsírsejtek átmérőjét is. Ebben a kísérletben a dermis vastagsággal jellemzett kollagén mennyiségi elemzése mellett szín dekonvolúciós technikával a kollagén minőségi elemzésére is objektív szövettani értékelést alkalmaztunk [143, 144]. Utóbbi során digitális képelemző szoftverrel speciális szűrő segítségével kiemelhető a van Gieson festett képekből a kollagénre jellemző szín, továbbá egyidejűleg minimálisra csökkenthető a zaj aránya. Ezt követően a korábbi fejezetben leírtak szerint integrált optikai denzitás meghatározás segítségével objektívizálható a kollagén szerkezet sűrűsége.

3.5 Statisztikai elemzések

I. kísérlet:

Az első kísérlet során a vizsgált csoportok alacsony egyedszáma miatt nem tudtunk megbízható statisztikai próbákat alkalmazni. Szemléltetésképp az ábrákon a vizsgált paraméterek, mint testtömeg, SHG intenzitások, dermis vastagság és adipocita méret számtani átlagait hasonlítottuk össze.

II. –III. kísérlet:

A második kísérlet ábráin a mért értékek számtani átlagait tüntettük fel. A hibasáv a standard deviációt (SD) jelzi. Az ábrák elkészítéséhez Origin Pro (OriginLab, USA), MedCalc (MedCalc, Belgium) és Prism (GraphPad, USA) statisztikai programokat használtunk. A csoportokon belüli normál eloszlást Shapiro-Wilks teszt segítségével igazoltuk. A csoportokon belüli összehasonlításokra egyutas varianciaanalízist (one-way ANOVA), illetve két faktor, az idő és a diéta, egyidejű figyelembevételkor kétutas varianciaanalízist (two-way repeated measures ANOVA) alkalmaztunk. A kapott eredményeket Tukey post hoc- teszttel validáltuk. Az értékelés során a $P < 0.05$ –értéket tekintettük szignifikánsnak.

3.6 Etikai háttér

A projekt engedélyezése iránti kérelmünket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságához, illetve a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Növény és Talajvédelmi Főosztályához adtuk be a hatályos jogszabályoknak megfelelően.

Kísérleti tevékenységünk alap kutatásnak felelt meg, így ennek megfelelően az engedély megkérése során rövid tudományos háttérrel megalapozott célkitűzéseinket és a tevékenység során alkalmazott módszereket kérelmünkben részleteztük. Az etikai engedély elbírálásánál alapvető szempont, hogy az érvényben levő magyar, illetve Európai Unió törvényi rendeleteknek megfelelően járjanak el a kutatók (40/2013 (II.14.) Kormányrendelet 45. §). A legfőbb alapvetés, hogy a projekt során alkalmazott kísérleti állatoknak a lehető legkevesebb szenvedést kelljen eltűrniük. Az általunk végzett kísérletsorozat a 63/2010/EU Irányelv VIII. mellékletében meghatározott szempontok alapján „enyhe” súlyossági kategóriába történő besorolást nyert. Ezt úgy értük el, hogy csak olyan eljárásokat alkalmaztunk, amelyek során az állatot csak rövid ideig tartó enyhe

fájdalom, illetve szenvedés érte. Ilyenek voltak például a gépi szőrtelenítés, az altatásban végzett *in vivo* nemlineáris mikroszkópia, illetve a szintén altatásban végzett szövettani mintavétel. Az általunk végzett eljárások során az állat jólléte vagy általános állapota nem romlott számottevően, mivel a választott Avertin oldattal történő altatási mód irodalmi adatok alapján kíméletesnek és biztonságosnak számít, ugyanis igen csekély a túlaltatás veszélye. A leginvazívabb eljárás a punch biopsia volt, melynek sebei azonban minden esetben szövődmény nélkül gyógyultak pár nap alatt. További alapvető feltétel, hogy az alkalmazott állatok számát racionalizálni és a lehető legkisebb mértékig csökkenteni kell. Természetesen a kísérletek sikerességének feltétele a statisztikai értékeléshez minimálisan szükséges egyedszám. A fenti szempontok alapján terveztük meg a vizsgált egércsoportok létszámát, az esetleges járulékos veszteségek lehetőségének figyelembevételével. Az alkalmazott egyedszám lehetővé tette az egerek „kényelmes” tartását, mivel nem kellett kihasználnunk a ketrecek maximális befogadóképességeit. Az egerek minden jogszabálynak megfelelő elhelyezése, tartása és gondozása a Semmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi Központ működési engedéllyel rendelkező (PEI/001/1548-3/2014) állatházában történt. Az állatház XXI. századi színvonalú állattechnológiai eszközökkel rendelkezik, steril (SPF) és konvencionális téréből áll. Kísérleti állataink a konvencionális térben kerültek elhelyezésre. Az állatok élettani igényeiknek megfelelő egyenletes környezeti tényezők (hőmérséklet, páratartalom, légnyomás) közt éltek. Az állatok Eurostandard II.L polikarbonát ketrecekben kerültek elhelyezésre, melynek alapterülete 530 cm². A ketrec kapacitása 5-9 egér, fedőrácsa önetető kosárral és palackos önitatóval volt felszerelve. A vizsgálatok alatt maximum 5 egér került egy ketrecekbe. Környezetgazdagítás céljából papírhengereket és fa tipliket helyeztünk a ketrecekbe. Az egerek folyamatos táp és vízellátása, valamint ketrecek tisztántartása és a higiénikus lakóhely biztosított volt az állatházi gondozók által. A projekt során alkalmazott kísérletben az állatok egy része a speciális takarmányozás miatt egyedi tartást igényelt. Emellett a kalória restrikción tartott ob/ob knock-out állatokat egyesével tartottuk, a takarmány pontos adagolása érdekében. A különböző diétákon kívül egyéb speciális gondozást nem alkalmaztunk. Az állatházban történt továbbá az állatok altatása, szőrtelenítése, súlymérése, futtatása, szövettani mintavétele, majd a projekt lezárása után az állatok eutanáziája. Az állatok eutanáziája a kísérlet lezárásakor túlaltatással történt, 150 mg/kg nátrium barbiturát (Sigma-Aldrich) i.p. injekció

beadásával. Az *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával történt mérések az MTA Wigner Fizikai Kutatóközpontban történtek. Az állatok szállítása az arra alkalmas, kisállatkereskedésben kapható, rágcsáló szállítódobozban történt. A vizsgálat körülbelül 45-60 percet vett igénybe, mely idő alatt az állatok nem éreztek fájdalmat.

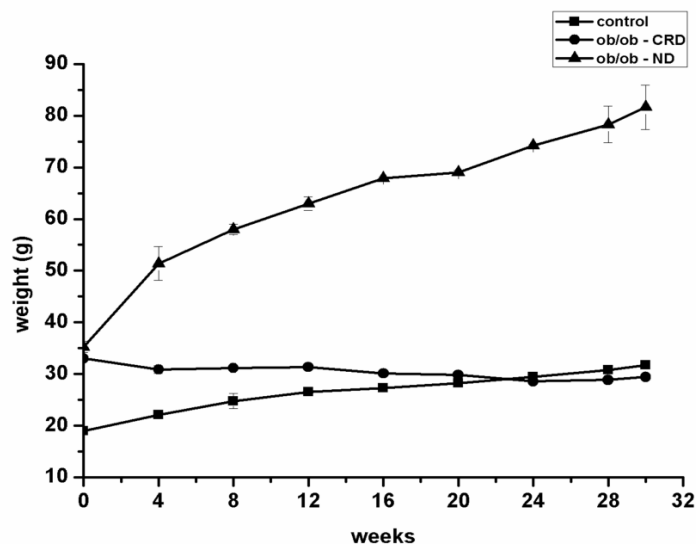
A projekt tervezése során a 40/2013- II.14. kormányrendeletnek megfelelően jártunk el, így a Pest Megyei Kormányhivatal a kísérletek elvégzésére jogosító hatósági engedélyt PEI 001/800-6/2015- ügyiratszámmal ellátva megadta.

4. Eredmények

4.1 Testsúly változása

I. kísérlet:

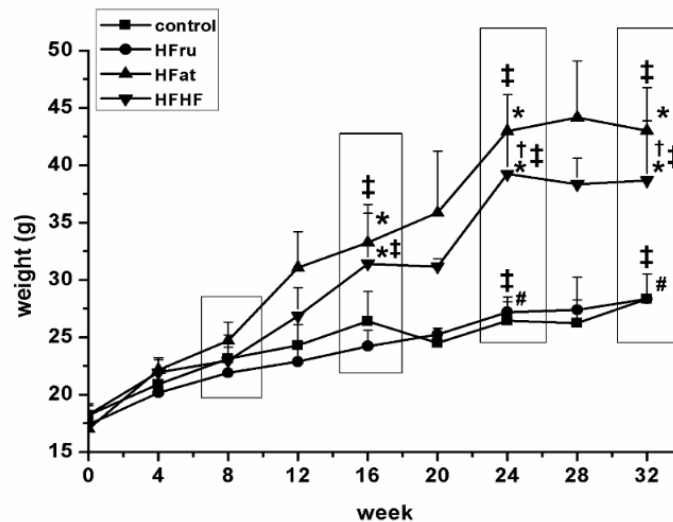
A kísérlet kezdetekor az egerek 8 hetesek voltak. Ebben az életkorukban az egerek már közelítik az azonos nemű és törzsű kifejlett kísérleti állatokra jellemző átlagsúlyt. Ennek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a különböző diéták bevezetés pillanatában már jelentős súlykülönbség volt a kontrol és az ob/ob csoportok között (control: 24.63g, ob/ob-CRD: 37.76g, ob/ob-ND: 40.23g). A kísérleti periódus végére a kontrol csoportban csak kisfokú súlygyarapodást észleltünk, az egerek átlagos súlya az adott törzs átlagos súlytartományába esett (30.10g). A 0. héten bevezetett kalóriamegszorítás hatására az ob/ob-CRD csoportban további súlynövekedés nem következett be, a kísérleti periódus végén súlyuk nem tért el számottevően a kontrolcsoporttól (28.43g). Az *ad libitum* takarmányhozzáféréssel tartott, nem diétázó, ob/ob-ND csoportban azonban egy gyors ütemű súlygyarapodást figyeztünk meg. A 0. héten súlyuk megegyezett az ob/ob-CRD csoportéval. 8 hét után azonban a másik két csoporthoz képest megkétszereződött, majd a kísérlet végére súlyuk majdnem megháromszorozódott a másik két csoporthoz képest (84.56g). (7.ábra)



7. ábra A diagram az egerek súlyváltozását mutatja be a kísérleti időszak alatt. Az Y tengelyen a súly (weight) van feltüntetve gramm mértékegységben, az X tengelyen pedig a kísérleti hetek (weeks). A kontrol (control), kalóriamegszorításban részesülő ob/ob egerek (ob/ob-CRD, calorie restricted diet) és az *ad libitum* táplált ob/ob egerek (ob/ob-ND, no diet) változásait és átlagos súlyait vonaldiagramok jelölik.

II. kísérlet:

A kísérlet kezdetekor az egerek 6 hetesek voltak. A különböző diéták bevezetése pillanatában a csoportok átlagos testsúlyában nem volt különbség. A 8-ik vizsgálati héten még nem volt szignifikáns különbség a csoportok átlagai között, de ekkorra már mindegyik egyed elérte a kifejlett példányra jellemző átlagos súlyt (control: $23.15 \pm 2.04\text{g}$, HFru: $21.9 \pm 1.32\text{g}$, HFat: $24.7 \pm 1.6\text{g}$, HFHF: $22.95 \pm 1.19\text{g}$). (8. ábra)



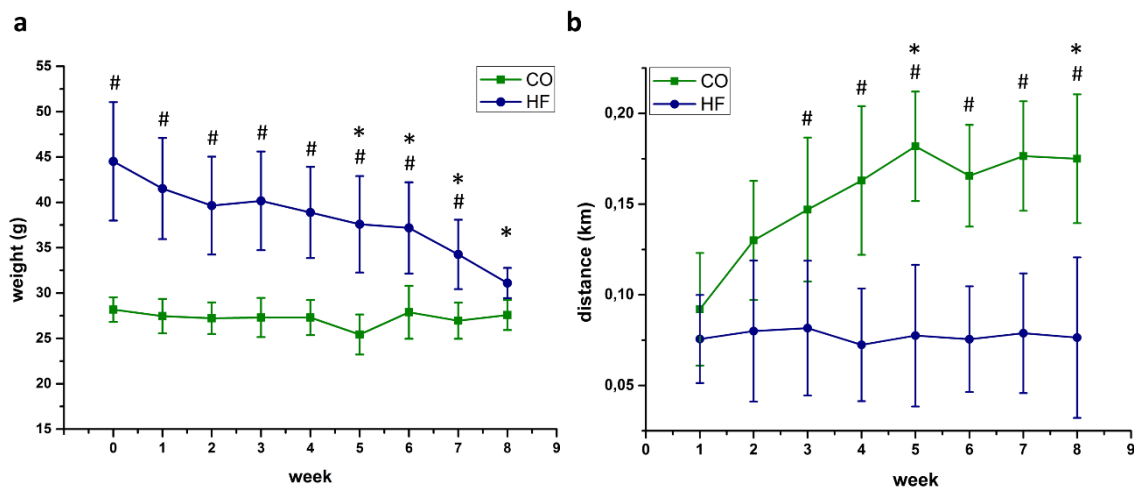
8. ábra A diagram az egerek súlyváltozását mutatja be a kísérleti időszak alatt. Az Y tengelyen a súly (weight) van feltüntetve gramm mértékegységben, az X tengelyen pedig a kísérleti hetek (week). A kontrol (control), magas zsírtartalmú diétát kapó (HFat- high fat diet), magas zsírtartalmú és fruktóz tartalmú ivóvizet kapó (HFHF- high fat high fructose diet) és a normál táp mellett fruktóz tartalmú ivóvizet kapó (HFru- high fructose) csoportok átlagos súlyait vonaldiagramok jelölik. A statisztikai szignifikanciát ($p < 0.05$) kétutas ANOVA teszttel határoztuk meg: * $p < 0.05$ összehasonlítva a kontrollal, # $p < 0.05$ összehasonlítva a HFat csoporttal, † $p < 0.05$ összehasonlítva a HFru csoporttal, ‡ $p < 0.05$ összehasonlítva az azonos csoport 8-ik heti átlagával. A hibaszáv a standard deviációt mutatja (SD).

A statisztikai összehasonlításokhoz azoknak a heteknek az adatait használtuk fel, amelyeken SHG méréseket is végeztünk. A magas zsírtartalmú diétával táplált HFat csoport ($35.85 \pm 5.3\text{g}$) és a magas zsírtartalmú diéta mellett fruktózos vizet kapó HFHF csoport ($31.4 \pm 4.4\text{g}$) a 16-ik héten már szignifikáns súlykülönbséget mutatott a kontrolcsoporthoz ($26.4 \pm 2.61\text{g}$) képest. Az említett két csoport között nem volt különbség, viszont a saját 8-ik heti eredményeikhez képest már szignifikáns súlynövekedés mutatkozott. A normál táp mellett fruktózos vizet kapó HFru csoport ($24.22 \pm 1.3\text{g}$) átlaga nem mutatott szignifikáns különbséget a kontrolcsoporthoz képest. A HFru csoport

értékei végig követték a kontrolcsoportét. A 24-ik héttől a HFat ($42.97 \pm 3.17\text{g}$) és HFHF csoport ($39.23 \pm 3.6\text{g}$) átlagai szétváltak, végig a HFat csoportban mértünk magasabb súlyokat, de közöttük statisztikai különbséget nem találtunk. A 24-ik héten az említett csoportok átlagai a kontrol ($26.42 \pm 2.08\text{g}$) mellett a HFru csoport ($27.2 \pm 0.8\text{g}$) átlagától is szignifikánsan eltértek. A 32-ik hétre a HFat ($43 \pm 3.7\text{g}$) és HFHF ($38.6 \pm 5.23\text{g}$) csoportok átlagai már nem mutattak további növekedést, mind a kontrol ($27.35 \pm 1.87\text{g}$), mind pedig a HFru ($28.33 \pm 2.2\text{g}$) csoportokétól szignifikánsan eltértek. A 24 és 32-ik heteken a HFru és kontrolcsoport átagai a saját 8-ik heti eredményeikhez képest szignifikáns emelkedést mutattak, de a standard C57/BL6 egerek felnőttkori átlagos súlyához képest nem mutattak jelentős eltérést. (8. ábra)

III. kísérlet:

A kísérlet kezdetekor a vizsgált magas zsírtartalmú táppal etetett (HF- high fat diet: $44,92 \pm 5.57\text{g}$) és a normál tápot kapó kontrol (CO- control: $28.17 \pm 1.36\text{g}$) csoportok között szignifikáns súlykülönbség volt. A 0-ik héten, az önkéntes testmozgás bevezetésekor az egerek 40 hetesek voltak.



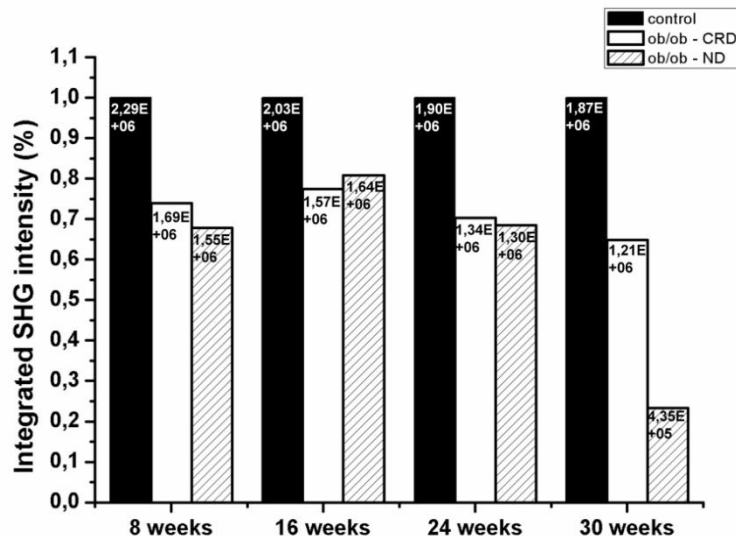
9. ábra a: A diagram az egerek súlyváltozását mutatja be a kísérleti időszak alatt. Az Y tengelyen a súly (weight) van feltüntetve gramm mértékegységben, az X tengelyen pedig a kísérleti hetek (week). A kontrol (CO) és a magas zsírtartalmú diétát kapó (HF- high fat diet) csoportok átlagos súlyait és azok változásait vonaldiagramok jelölik. A statisztikai szignifikanciát ($p < 0.05$) kétutas ANOVA teszttel határoztuk meg: # $P < 0.05$ a kontrollal összehasonlítva; * $P < 0.05$ azonos csoporton belül az első héthez hasonlítva. **b:** A diagram az egerek által, az adott hét napjain, megtett átlagos távolságot mutatja be a kísérleti időszak alatt. Az Y tengelyen a távolság (distance) van feltüntetve kilométer mértékegységben, az X tengelyen pedig a kísérleti hetek (week). A statisztikai szignifikanciát ($p < 0.05$) kétutas ANOVA teszttel határoztuk meg: # $P < 0.05$ a kontrollal összehasonlítva; * $P < 0.05$ azonos csoporton belül az első héthez hasonlítva.

Az 5-ik héten a HF csoportban ($37.58 \pm 5.3g$) a kezdeti súlyukhoz képest már szignifikáns súlycsökkenést észleltük, mely a kísérlet végéig folytatódott. A kontrol csoport súlya az egész kísérleti időszak alatt stagnált, szignifikáns eltérést nem mutatott egyik héten sem. A vonaldiagramon látható, hogy a két csoport értékei hétről hétre közelítettek egymáshoz. A 8-ik héten a HF csoport ($31.1 \pm 1.66g$) átlaga továbbra is meghaladta a kontrolcsoportét ($27.57 \pm 1.65g$), de a szignifikáns különbség eltűnt. Az önkéntes testmozgás során hetente megtett átlagos távolságokat szintén vonaldiagramon szemléltettük. A 3-ik héttől kezdve szignifikánsan nagyobb távolságot regisztráltunk a kontrol csoport esetén a HF csoportéhoz képest. Itt fordított tendenciát láttunk, miszerint a kontrol egerek tettek meg hétről hétre nagyobb távolságot (1. hét: $0.0756 \pm 0.08km$, 8. hét: $0.0766 \pm 0.078km$). A HF csoport értékei a kísérleti időszak alatt érdemben nem változtak (1. hét: $0.166 \pm 0.41km$, 8. hét: $0.092 \pm 0.026km$). (9. ábra)

4.2 SHG és CARS mérések

I. kísérlet:

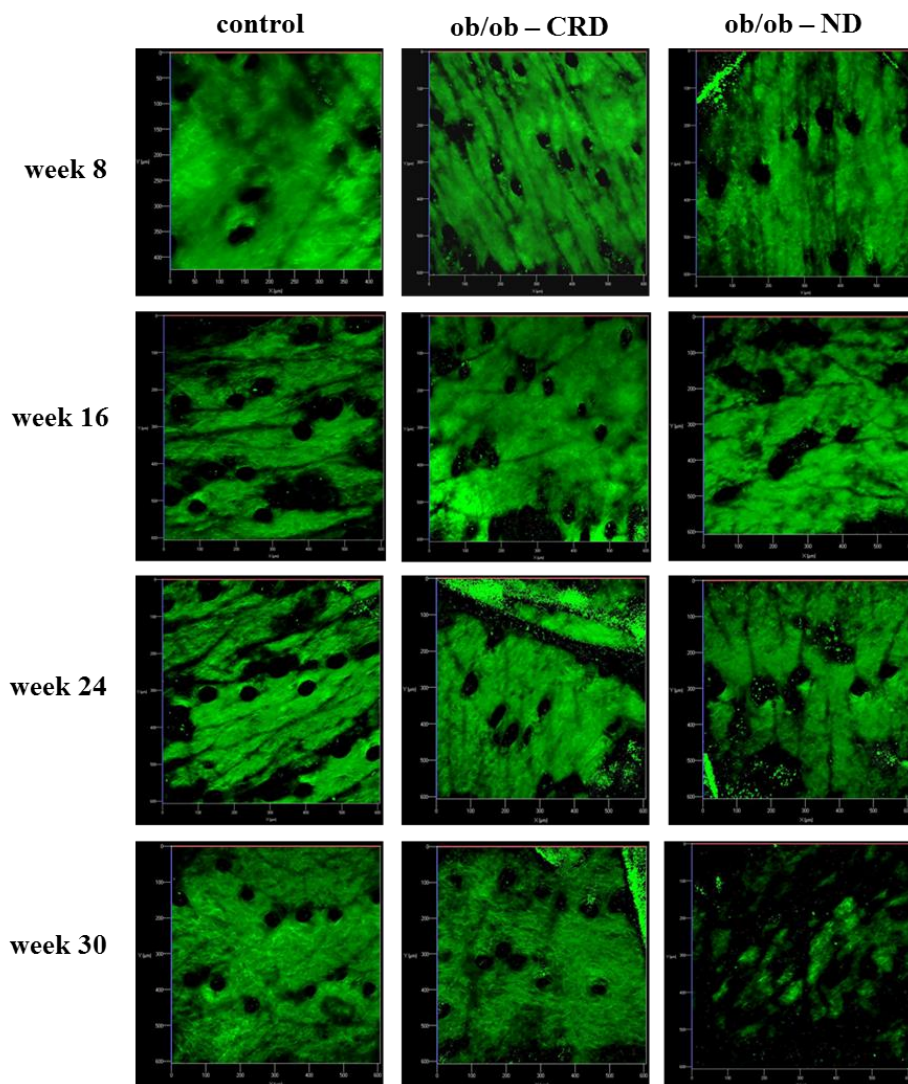
A vizsgálati periódus során négy alkalommal végeztünk *in vivo* SHG méréseket. A kísérlet kezdetekor az egerek 8 hetesek voltak, a kísérlet előtt minden egyed *ad libitum* táplálkozott.



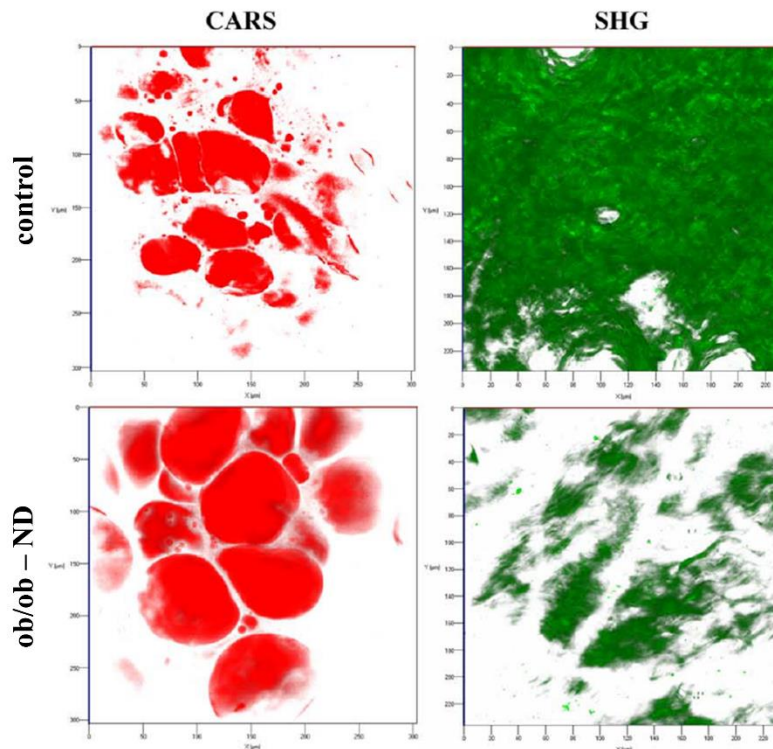
10. ábra Az oszlopdiagram az egerek SHG intenzitás értékeit ábrázolja a kísérleti időszak alatt végzett négy *in vivo* mérés időpontjában. Az Y tengelyen az integrált SHG intenzitás szerepel százalékos eloszlás szerint. A szemléltetés során a kontrolcsoportéhoz viszonyítottunk, így az egyes időpontokban kontrolcsoport értékei jelentik a 100%-ot. Az x tengelyen a kísérleti heteket tüntettük fel (weeks). A kontrol (control), kalóriamegszorításban részesülő ob/ob egerek (ob/ob-CRD, calorie restricted diet) és az *ad libitum* táplált ob/ob egerek (ob/ob-ND, no diet) értékeit az

Az első mérésre a kísérlet 8-ik hetén került sor, mire az egerek kifejlett példányokká váltak. Az ob/ob-ND és ob/ob-CRD csoportokban ekkor már alacsonyabb SHG intenzitást detektáltunk a kontrollhoz képest. A 16. és 24-ik héten az ob/ob csoportok SHG intenzitása nem változott számottevően a kontrollhoz viszonyítva. (10. ábra)

A 30-ik héten, amikor az ob/ob-ND csoport egerei majdhogynem megháromszorozták a súlyukat, már jelentős SHG intenzitás beli különbség mutatkozott a kontrollhoz viszonyítva az utóbbi javára. Az ob/ob-CRD csoportban, ahol a kalóriarestrikciónak köszönhetően súlygyarapodás nem következett be, a kontrollhoz képest változatlan SHG intenzitást találtunk. (10, 11. ábra)



11. ábra: Az ábrán a kontrol (control), kalóriamegkorlátozásban részesülő ob/ob egerek (ob/ob-CRD, calorie restricted diet) és az ad libitum táplált ob/ob egerek (ob/ob-ND, no diet) különböző időpontokban rögzített *in vivo* 3D SHG képeit ábrázoljuk. A 30-ik héten jól látható az ob/ob-ND egér kollagén struktúra romlására utaló csökkent SHG jel (zöld szín fekete háttérrel).

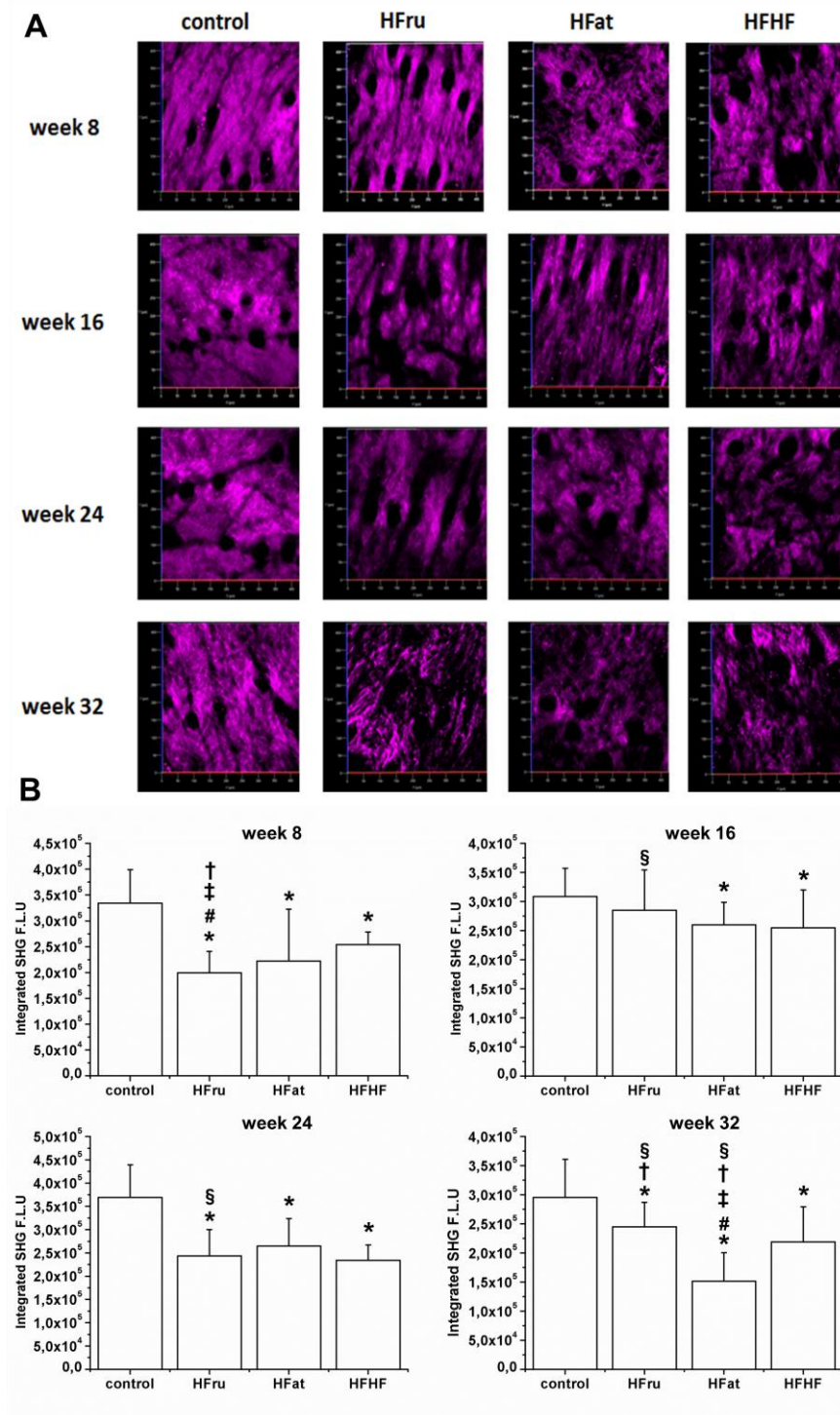


12. ábra Az ábrán a kontrol (control) és az ad libitum táplált ob/ob egerek (ob/ob-ND, no diet) 30-ik héten rögzített *in vivo* 3D SHG és *ex vivo* 3D CARS képeit ábrázoljuk. Jól látható az ob/ob-ND egér kollagén struktúra romlására utaló csökkent SHG jel (zöld szín fehér háttérrel) mellett a megnövekedett zsírsejteket ábrázoló, azokat kirajzoló CARS jel (piros szín fehér háttérrel).

Az I. kísérlet végén, a 30-ik héten az egerek terminálását követően a korábbi SHG felvételeknek megfelelő hátbőri régiókból szövettani mintavételre került sor. A formalinos fixálást megelőzően *ex vivo* CARS méréseket végeztük az ob/ob-ND és kontrol csoportokon. A 3D CARS képeken jól tudtuk szemléltetni az adipociták jelentős méretnövekedését a kontrolhoz képest. Az SHG jel csökkenésével párhuzamosan a detektált CARS jel nőtt, és a zsírsejtek morfológiája azonosítható volt. (12. ábra)

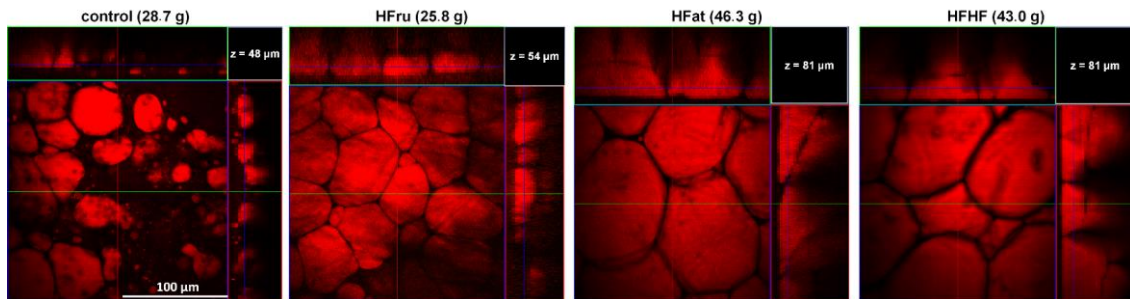
II. kísérlet:

A második kísérlet során is négy időpontban készült *in vivo* SHG felvétel a négy különböző egércsoportról. A kísérlet kezdetekor az egerek 6 hetesek voltak, a kísérlet során minden egyed *ad libitum* táplálkozott a már említett különböző diéták bevezetését követően. Az első *in vivo* SHG mérésre a kísérlet 8-ik hetén került sor, mire az egerek kifejlett példányokká váltak.



13. ábra A: Csoportonként egy egér 3D SHG képe a különböző mérési időpontok alkalmával. B: Az oszlopdiagramok az egyes mérési időpontokban detektált SHG intenzitások integrált optikai denzitását szemléltetik. A statisztikai értékelést kétutas ANOVA-val végeztük: * $p < 0.05$ a kontrolhoz képest, # $p < 0.05$ a HFat csoporthoz képest, § $p < 0.05$ azonos csoport 8-ik heti eredményéhez képest, † $p < 0.05$ azonos csoport 16-ik heti eredményéhez képest, ‡ $p < 0.05$ azonos csoport 24-ik heti eredményéhez képest.

Az értékelés során a kontrolhoz képest mindegyik csoportban szignifikáns SHG intenzitás csökkenést találtunk. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a mérés időpontjában több egér a szörnövekedési ciklus anagén fázisában volt, ami rontotta a képek értékelhetőségét. Emiatt az eredményeket fenntartásokkal kezeltük. A további mérési időpontokban konstansan szignifikáns csökkent SHG jelet észleltünk a különböző diétákon lévő csoportokban a kontrolcsoporthoz viszonyítva, mely megerősítette a kollagén szerkezet romlásának tényét. Utóbbi alól az egyetlen kivételt a HFru csoport 16-ik heti eredményénél találtuk. A HFru csoport esetében észleltük a kontrolhoz viszonyított legkisebb csökkenés. A kísérlet végére, a 32-ik héten a HFat csoportban szignifikánsan alacsonyabb SHG intenzitást mértünk a HFru és HFHF csoportokhoz képest is. A HFHF csoportban a kísérlet során szintén csökkenő tendenciát láttunk, de a kísérlet végén a HFat csoportban mértekhez magasabb SHG intenzitást mutattak. A 3D SHG képeken a kontrol egerekben szabályosnak imponáló, rostgazdag kollagén szerkezetet láttunk a különböző mérési időpontokban. A HFHF és HFat csoportokban nagyobb fokú kollagéndegradációt észleltünk a súlynövekedéssel párhuzamosan, míg a HFru csoportban ez mérsékeltebb volt. (13. ábra)



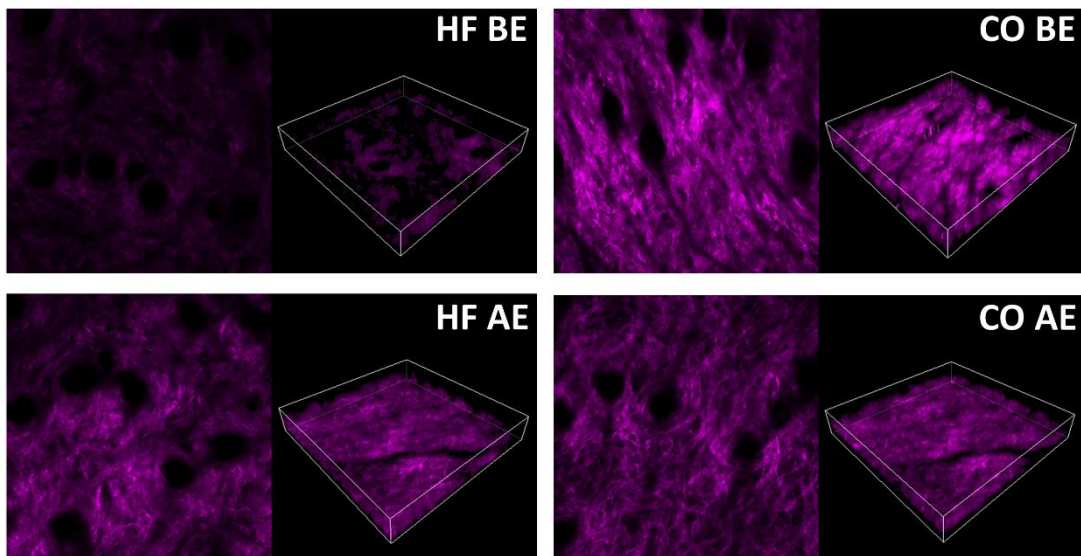
14. ábra A képeken a 32-ik heti *ex vivo* CARS mérés során rögzített képek láthatóak, melyeken jól látható a zsírsejtek jelentős méretnövekedése a HFat és HFHF csoportokban.

Ebben a kísérletben szintén elvégeztük az utolsó SHG méréseket követően a 32-ik héten végzett biopsziákból a zsírszövet *ex vivo* CARS vizsgálatát. A mintavétel itt is megegyezett a korábbi SHG mérések során vizsgált háti bőrterületekkel. A különböző csoportok között itt is jelentős eltéréseket láttunk. A HF és HFHF csoportokban jelentősen megnövekedett zsírsejteket találtunk a kontrol és a HFru csoportokhoz képest. Utóbbi kettő között azonban nem találtunk szignifikáns eltérést. (14. ábra)

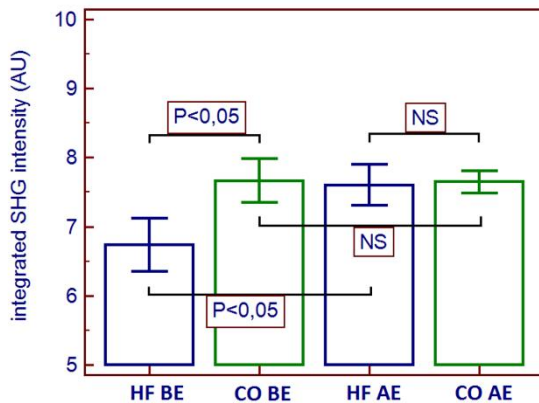
III. kísérlet:

Ebben a kísérletben eltérően az előző kettőtől csak két alkalommal történt *in vivo* SHG mérés. Először a testmozgás bevezetése előtt (BE-before exercise), a 0-ik kísérleti héten, majd második alkalommal a kísérlet terminálisakor (AE-after exercise). Mivel itt is 8 hét telt el a két mérési időpont között, a korábbi kísérletekkel megegyezően, így az eredmények összevethetők a korábbiakkal.

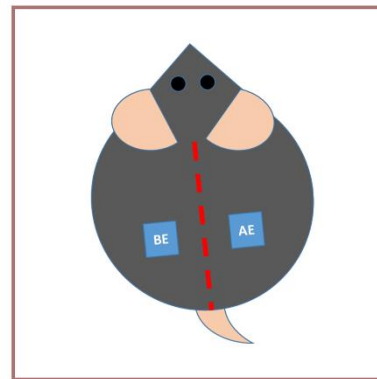
a



b



c



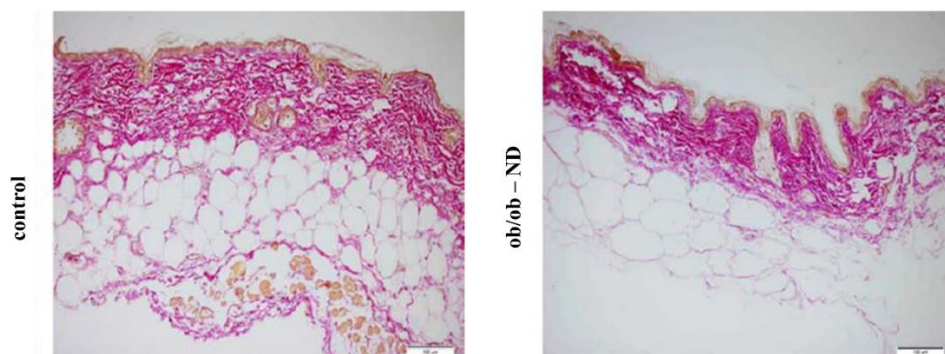
15. ábra a: A képek a testmozgás megkezdése előtti (BE) és utáni (AE) SHG intenzitásokat mutatják be a vizsgált csoportok egy-egy egerén. A bal oldali képeken egy szelet látható a Z-stackből, míg a jobb oldaliakon a 3D rekonstrukciót mutatjuk be. **b:** Az oszlopdiagramon az SHG intenzitás értékei szerepelnek integrált optikai denzitásuk átlagai szerint. A statisztikai értékelést kétutas ANOVA teszttel végeztük. A szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket az oszlopok felett ábrázoltuk. **c:** A vizsgált egerek sematikus rajza, melyen a testmozgás előtti (BE, week 0) és utáni (AE, week 8) SHG mérésekre és szövettani mintavételre kijelölt vizsgálati régiókat (ROI region of interest) szemléltetjük.

A kísérlet kezdetekor szignifikáns súlykülönbség volt a két egércsoport között. A magas zsírtartalmú diétán lévő HF csoportban szignifikánsan alacsonyabb SHG intenzitást mértünk a kontrol CO csoporthoz képest. Az első mérés után egyből biopsziát végeztünk az egér hátának egyik oldalán kijelölt vizsgálati régióból. A nyolc hetes önkéntes testmozgás hatására a HF egerek súlya szignifikánsan csökkent és ezzel együtt az SHG intenzitásuk szignifikánsan növekedett. A terminálás előtt végzett második mérés során már nem találtunk különbséget a két csoport SHG eredményei között. Szintén nem volt különbség a kontrolcsoporton belül a két időpontban végzett mérések eredményeiben. A második mérés után az ellenoldali vizsgálati régióból is megtörtént a szövettani mintavétel. (15. ábra)

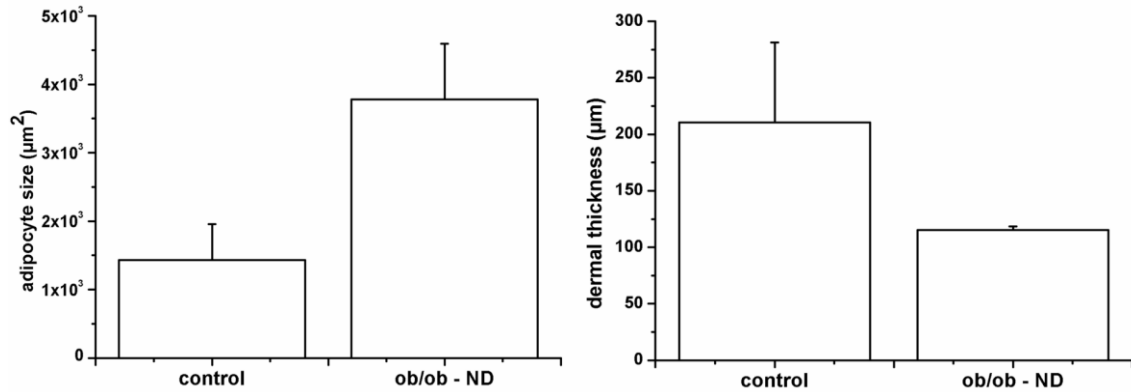
4.3 Szövettani értékelés

I. kísérlet:

Az első kísérlet szövettani értékelését a 30-ik héten vett punch biopsziás mintákon végeztük. A kollagénspecifikus van Gieson festéseken összehasonlítottuk a csoportok kötőszöveti szerkezetét. A kontrolcsoportban, az egy-egy helyen észlelt technikai műterméken kívül, szabályosan rendeződő kollagén rostokat figyeltünk meg. Az ob/ob-CRD csoportban (dermis: 176,22 μm , adipocita: 1712,35 μm^2) nem találtunk lényegi eltérést a kontrol dermis vastagságához (210,42 μm) és zsírsejtméreteihez képest (1429,12 μm^2). Ezzel szemben az ob/ob-ND csoportban a szignifikáns súlynövekedés következtében lényegesen nagyobb zsírsejtméretet (3678,06 μm^2) és jelentősen vékonyabb dermis vastagságot mértünk (115,2 μm). A kollagénszerkezet nagyfokú töredezettsége kollagéndegradációra utalt. (16, 17. ábra)



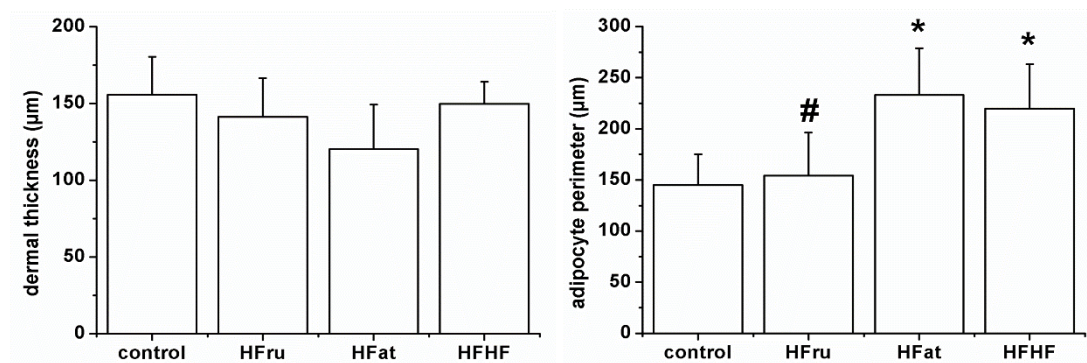
16. ábra: Az ábrán a WvG festett képeken egy kontrol (control) és egy ad libitum táplált ob/ob egér (ob/ob -ND) metszetét láthatjuk. Megfigyelhetők a kollagénszerkezetbeli különbségek, továbbá az ob/ob egérben látható zsírsejtméret növekedés.



17. ábra: A bal oldali oszlopdiaagramon a kontrol (control) és ad libitum táplált ob/ob egerek (ob/ob –ND) zsírsejtméreteit vetjük össze. A jobb oldali oszlopdiaagramon a kontrol (control) és ad libitum táplált ob/ob egerek (ob/ob –ND) irha vastagságát hasonlítjuk össze.

II. kísérlet:

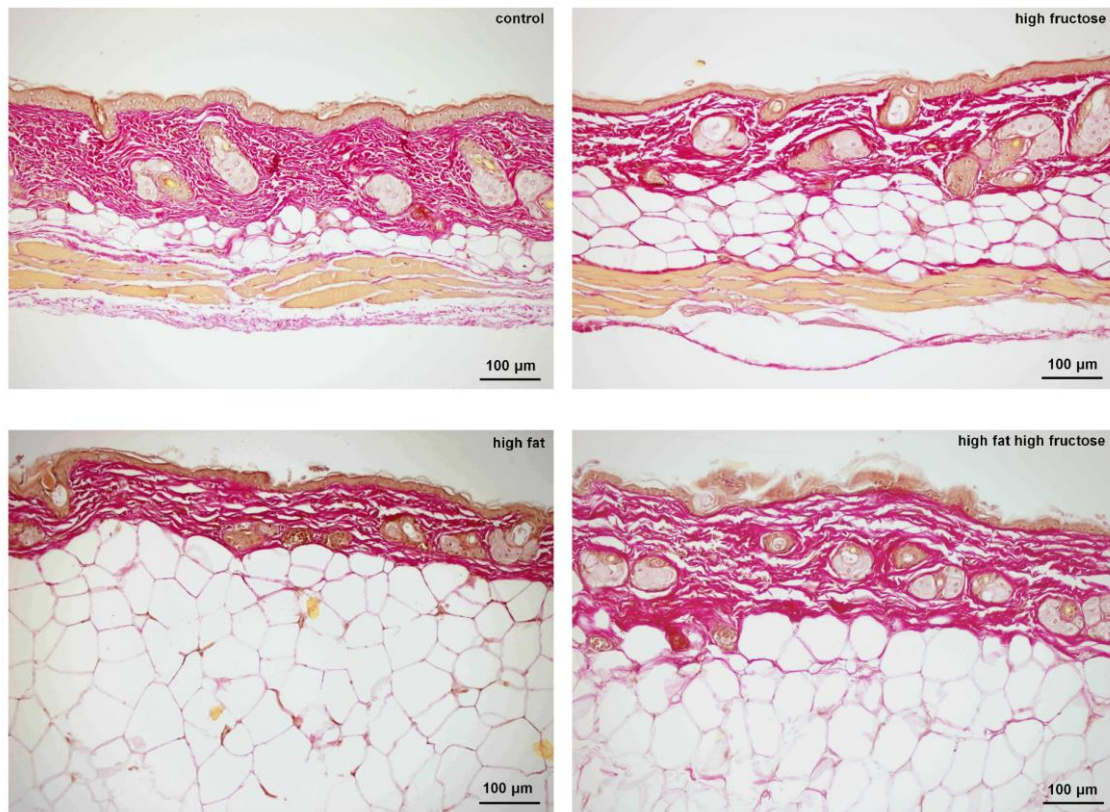
A második kísérlet szövettani értékelését a 32-ik héten vett punch biopsziás mintákon végeztük. Kollagénspecifikus van Gieson festéseken hasonlítottuk össze a csoportok kötőszöveti szerkezetét. (19. ábra)



18. ábra: A bal oldali oszlopdiaagramon a kontrol (control), HFru, HFat és HFHF csoportok irha vastagságát hasonlítjuk össze. A jobb oldali oszlopdiaagramon a csoportok zsírsejtméreteit vetjük össze. A statisztikát egyutas ANOVA-val végeztük: *p < 0.05 a kontrollal összehasonlítva, #p < 0.05 a HFat csoporttal összehasonlítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják.

A kontrolcsoportban szabályosan rendeződő rostokat, tömött kollagénszerkezetet figyeltünk meg. Ezzel szemben a többi csoportban egyértelmű kollagéndegradációra utaló töredezettséget, szabálytalan lefutású kollagénrostokat találtunk. A dermis szemmel láthatóan elvékonyodott a HFat csoportban (control: 155.38±20.34 µm, HFru: 136.14±22.18 µm, HFat: 120.15±27.54 µm, HFHF: 149.83±6.24 µm). A HFat és HFHF csoportokban találtuk a legnagyobb zsírsejtméret növekedést, melyek szignifikánsan

nagyobbak voltak a kontrolhoz képest (control: $143.74 \pm 15.13 \mu\text{m}$, HFru: $155.17 \pm 37.8 \mu\text{m}$, HFat: $229.84 \pm 35.78 \mu\text{m}$, HFHF: $213.58 \pm 42.19 \mu\text{m}$). A HFru csoportban nem észleltünk nagyfokú dermis vékonyodást, de a kollagénszerkezet romlása itt is látható volt. Ugyanebben a csoportban a zsírsejtek sem nőttek meg szignifikánsan a kontrolhoz képest, mely nem volt meglepő, mivel a súlyuk sem tért el szignifikánsan a kontrolcsoportétól. A HFru csoport adipocitái továbbá szignifikánsan kisebbek voltak, mint a HFat csoport zsírsejtjei. (18, 19. ábra)

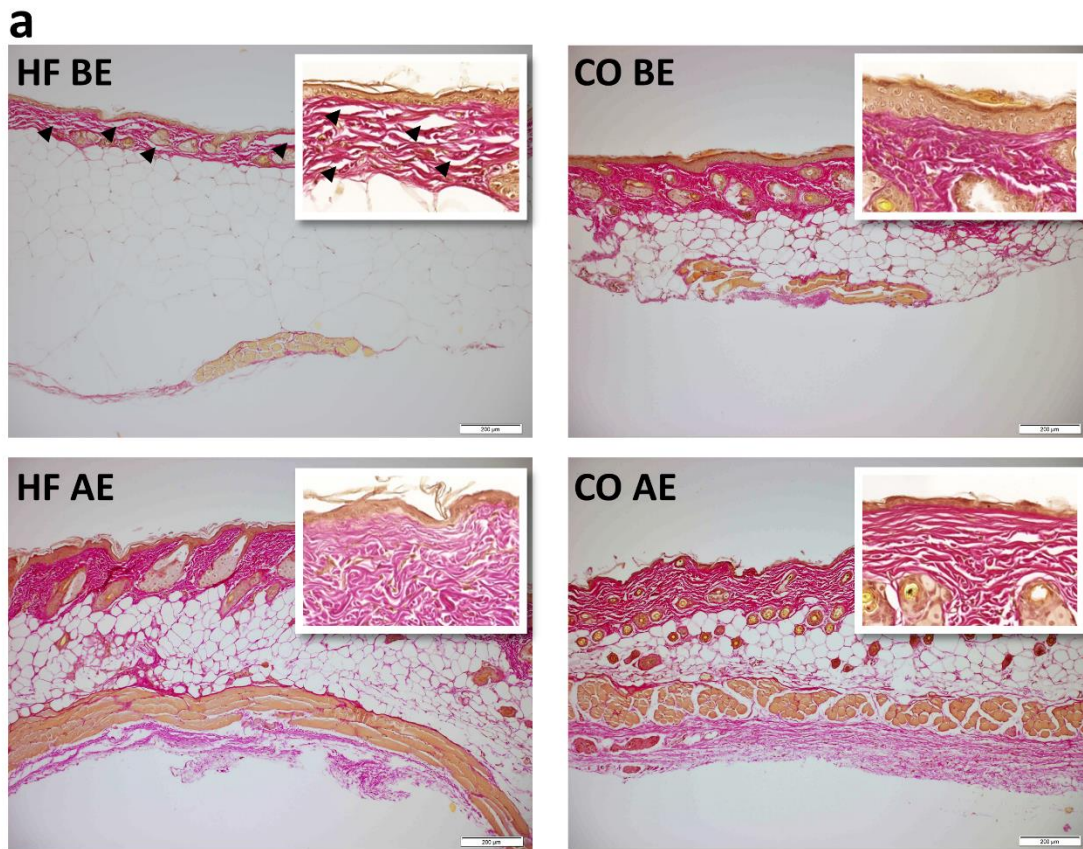


19. ábra Az ábrán a WvG festett képeken egy kontrol (control), HFru, HFat és HFHF csoportban lévő egér metszetét láthatjuk. Megfigyelhetők a kollagénszerkezetbeli és zsírsejtméretbeli különbségek.

III. kísérlet:

A harmadik kísérlet során az *in vivo* SHG méréshez hasonlóan a kísérleti periódus kezdetekor és terminálásakor is történt szövettani elemzés a fentiekben részletezett területekről vett mintákon. Kezdetben a HF csoportban elvékonyodott dermist láttunk (HF BE: $131.94 \pm 35.8 \mu\text{m}$, CO BE: $165.73 \pm 7.65 \mu\text{m}$), mely azonban az alkalmazott statisztikai próbával nem mutatott szignifikanciát. Mivel azonban a van Gieson festett

képeken a kollagénszerkezet jelentős töredezettségét észleltük, ebben a kísérletben egy új értékelési eljárást is bevezettünk, mely a kollagénszerkezet denzitását vizsgálva objektíven igazolta a szignifikáns minőségbeli különbséget a kontrolcsoporthoz képest (HF BE: 42.57 ± 13.71 , CO BE: 62.01 ± 8.55). Emellett a kezdeti vizsgálat során szignifikánsan nagyobb zsírsejteket (HF BE: $80.45 \pm 11.68 \mu\text{m}$, CO BE: $50.12 \pm 6.57 \mu\text{m}$) és subcutan zsírréteget (HF BE: $371.3 \pm 121.5 \mu\text{m}$, CO BE: $117.46 \pm 44.04 \mu\text{m}$) találtunk a HF csoportban. (20, 21. ábra)

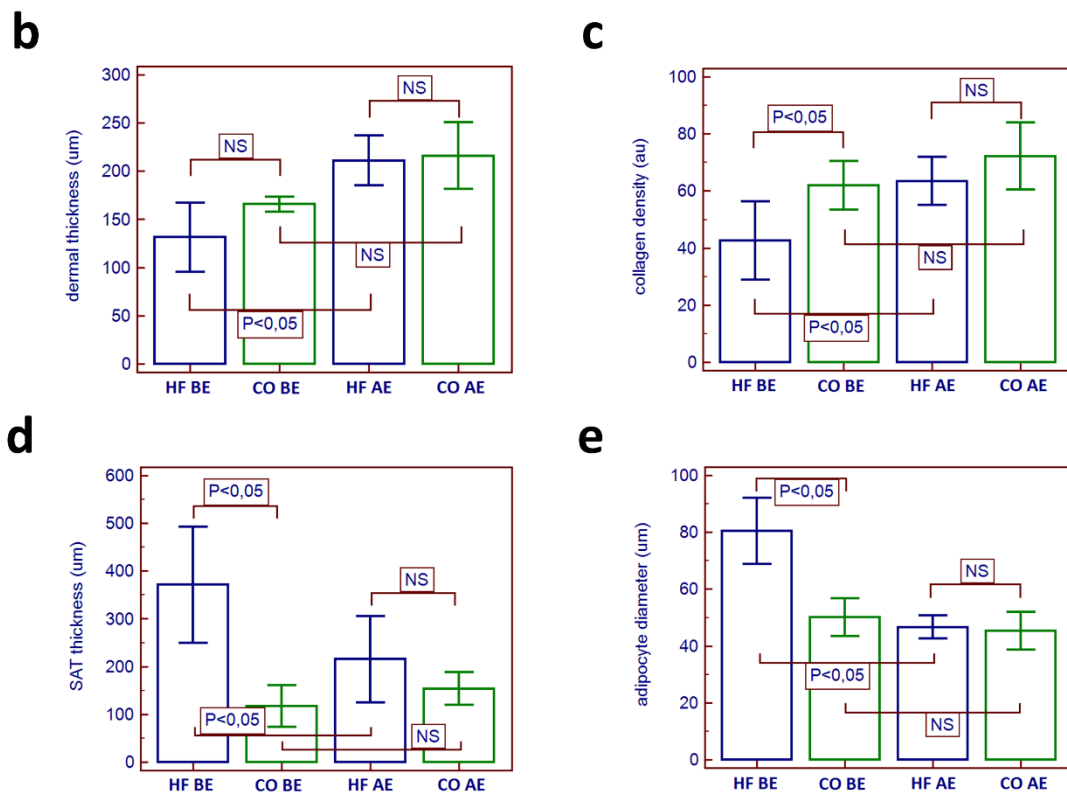


20. ábra: Az ábrán a WvG festett képeken a testmozgás megkezdése előtti (BE) és utáni (AE) állapotot mutatjuk meg egy- egy kontrol (CO) és magas zsírtartalmú diétán tartott (HF) egér metszetén. A testmozgás megkezdése előtt az elhízott egerekben (HF BE) szakadozott kollagénszerkezetet (fekete nyílhegy), elvékonyodott irhát és jelentős zsírsejtméret és zsírszövet kiszélesedést láttunk.

A 8 hetes önkéntes testmozgást követően ismételt szövettani vizsgálatot végeztünk. A van Gieson képeken a HF csoportban lényegesen kompaktabb kollagénszerkezetet találtunk. (20. ábra) A kezdetihez képest a dermis itt már statisztikailag kimutathatóan is szignifikánsan vastagabb volt. A testmozgás utáni értékelésnél a dermis vastagsága már nem különbözött lényegesen a kontrolcsoportétól

(HF AE: $210.96 \pm 25.82 \mu\text{m}$, CO AE: $216.03 \pm 34.39 \mu\text{m}$). A kvalitatív kollagén denzitás mérésénél ugyanezt figyelhettük meg (HF AE: 63.47 ± 8.45 , CO AE: 72.24 ± 11.66).

Ezekkel párhuzamosan a zsírszövet vastagsága (HF AE: $215.32 \pm 90.09 \mu\text{m}$, CO AE: $153.7 \pm 34.31 \mu\text{m}$) és a zsírsejtek méretei (HF AE: $46.67 \pm 4.12 \mu\text{m}$, CO AE: $45.32 \pm 6.6 \mu\text{m}$) szignifikánsan csökkentek a HF csoportban és a kontrolhoz képest már nem mutattak szignifikáns különbséget. (21. ábra)



21. ábra: Az oszlopdiagramokon a testmozgás megkezdése előtti (BE) és utáni (AE) irha vastagságot (b), kollagén denzitást (c), bőr alatti zsírszövet (SAT) vastagságot és zsírsejtméreteket (e) ábrázoltuk a testmozgás előtti (BE, week 0) és utáni (AE, week 8) időpontokban. A statisztikai értékelést kétutas ANOVA teszttel végeztük. A szignifikáns ($p < 0.05$) eltéréseket az oszlopok felett ábrázoltuk.

5. Megbeszélés

A túlzott szénhidrát és zsírdús tápanyagfogyasztás, továbbá a mozgásszegény életmód miatt az elhízás, metabolikus szindróma és 2-es típusú diabetes incidenciája világszerte növekszik [1-3]. A vezető halálokok háttérében lévő idegrendszeri és cardiovascularis következmények mellett a bőrgyógyászati szövődmények előfordulása is gyakoribbá válik [4, 5]. A legsúlyosabb terápiarezisztens alsó végtagi fekélyek, bőrfertőzések és jelentősen romló sebgyógyulási hajlam mellett számos viszonylag veszélytelen, de jelentős kozmetikai problémát okozó bőrelváltozást láthatunk [6-9]. Ezek háttérben az immundeficientia, neuropathia, micro- és macroangiopathia mellett a lokálisan az epidermisben, dermisben és subcutisban lezajló molekuláris változások állnak. A magas szöveti glükózszint miatt a proteinek, mint például a kollagén, glikációja mehet végbe a glikációs végtermékek felszaporodása mellett [12]. Emellett azonban manifesztálódó diabetes nélkül, pusztán a subcutan zsírszövet felszaporodása során indukálódó gyulladásos mechanizmusok által is elindul az extracelluláris remodeling [13, 14, 18-20]. A bőr szerkezeti és patológiai vizsgálatára szolgáló, legszélesebb körben elterjedt és elfogadott eljárás a szövettani mintavétel. A viszonylag alacsony kockázat és magas haszon miatt indokolt esetben elvégzése elengedhetetlen. Ugyanakkor, ha egy bőrbetegség kapcsán csak kiegészítő információkra van szükségünk a bőr szerkezetét illetően, vagy statusrögzítést, utánkövetést, esetleg egyszerre több régió mikroszkopikus felbontású vizsgálatát tervezzük, akkor megfelelő alternatívát jelenthetnek az *in vivo*, jelölés nélkül alkalmazható, non-invazív képalkotó eljárások. Az egyik ilyen eljárás a nemlineáris mikroszkópia, mely már a klinikai diagnosztikában is elérhető. Az „optikai biopszia”, számos előnye miatt, egy igen dinamikus fejlődő tudomány és mára már iparág is [24, 145-148]. Kutatócsoportunk egy konzorciumi projekt keretében részt vett egy hazai fejlesztésű *in vivo* képalkotásra alkalmas, multidiszciplinárisan felhasználható, TPEF, SHG és CARS technikákat kombináló berendezés fejlesztésében. Ennek kapcsán a fent már említett, utóbbi években intenzíven kutatott, kötőszöveti remodelinget vizsgáltuk emberi és állati mintákon különböző kísérleti felállásokban. A disszertációban részletezett kísérletsorozat elsődleges célja az elhízás és a testmozgás általi súlycsökkenés bőr kötőszövetre gyakorolt hatásainak vizsgálata volt *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával, különböző egérmodelleken.

A kísérletsorozat első, hosszú távú vizsgálatában a technikai beállítások hangolása mellett az elhízó ob/ob egerek bőrében lezajló szerkezeti változások karakterizálása volt a célunk [30]. A kollagénszerkezetet *in vivo* SHG technikával a zsírszövetet pedig *ex vivo* CARS technikával vizsgáltuk. Utóbbinál az eredeti célkitűzés szintén az *in vivo* képalkotás volt, mely során azonban technikai akadályba ütköztünk. Másik kísérleti felállásban sikeresen ábrázoltuk az epidermális lipideket *in vivo* is, de az alkalmazott beállítások mellett a lézer mélybe történő penetrációja nem volt elégséges a subcutan zsírszövet látótérbe hozásához. A lézerfényforrás teljesítményének növelésével elérhetővé válik a kívánt mélység leképezése, de ez már a szövetek termikus károsodásával jár. Biztonságtechnikai szempontok alapján emiatt csak *ex vivo* CARS vizsgálatot végeztünk a kísérlet végén eltávolított szövettani mintákon. Ezzel együtt is sikerült demonstrálnunk az elhízásra jellemző bőrkötőszöveti változásokat az elhízott ob/ob egereken. Irodalmi adatok alapján azt feltételeztük, hogy az SHG intenzitás egyenesen arányos a bőrben levő egészséges, glikációtól, keresztkötésektől, degradációtól mentes kollagénnel. Az *in vivo* SHG mérések során már az első méréstől fogva konstansan alacsonyabb értéket mértünk az obes csoportban a kontrolhoz képest. A kísérlet végén kollagénspecifikus festéssel jelölt szövettani mintákkal validáltuk eredményeinket. Megállapítottuk, hogy az *in vivo* SHG mérés megfelelően szenzitív a kollagénszerkezet eltéréseinek vizsgálatában, és már a korai károsodások értékelésére is alkalmas. Vizsgálatunkban az SHG intenzitás és a dermis vastagsága fordított arányban változott a testsúlyhoz viszonyítva, mivel mindkét paraméter esetében csökkenést láttunk a sovány egerek értékeihez képest. Ezzel szemben, a vártaknak megfelelően, a zsírsejtek mérete a súllyal együtt növekedett. A szintén ob/ob törzsről, de kalóriamegszorítással tartott egerek esetében nem láttunk drámai eltérést a kontrolokhoz képest. Ez megerősítette felvetésünket, miszerint elsődlegesen az életmód, nem pedig a genetikai háttér felel az elhízásért és annak következményeiért. Mivel a kísérlet során az alacsony csoportonkénti egyedszám miatt nem tudtuk adekvát statisztikai próbákkal alátámasztani észrevételeinket, így a kísérlet leginkább a képalkotóeljárás használhatóságát és képességeit demonstrálja. Mivel az SHG technikát stabilnak és minőségi képek felvételére alkalmasnak találtuk, így arra következtettünk, hogy a közeljövőben az alap kutatás mellett klinikai diagnosztikára is alkalmassá válhat. A kísérlet során abszolút előnye volt, hogy non-invazív módon, az egerek leölése nélkül tette lehetővé a dermis

eltéréseinek követését. Az alkalmazott CARS rendszer technikai korlátait a jövő fejlesztései fogják megoldani. Irodalmi adatok alapján az alacsonyabb ismétlési sebességű lézerforrások alkalmazása, a gerjesztő lézer hullámhosszának növelése, vagy a harmadik harmonikus keltés bevezetése jelentheti [149, 150].

Második kísérletünkben magas zsír-, magas zsír és fruktóz-, magas fruktóz- és standard kalória tartalmú diétákon tartott vad típusú egerek kollagénszerkezetét és zsírsejtjeit vizsgáltuk hasonló módon, mint az első kísérletben [31]. A magas zsírtartalmú táppal az obesitas indukálása volt a célunk [138]. A magas zsírtartalmú táppal együtt adott fruktózos ivóvízzel a szénhidrát és zsírdús táplálkozást kívántuk modellezni. A normál táp mellett fruktózos ivóvizet kapó egerek esetében a konstansan magas vércukorszintet szerettük volna elérni, mely a glikációs folyamatok beindulásáért felel [140, 141]. A subcutan zsírszövetben beinduló gyulladásozós reakciók mellett ez a másik kiemelt jelentőségű folyamat mely a kötőszövetek homeosztázisát befolyásolhatja. A glikáció egy spontán, nem enzimátikus úton végbemenő reakció. A redukáló cukrok karbonil csoportja és a hosszú-életű fehérjék, mint például a kollagén, szabad aminocsoportjai közötti kötés. Tartósan magas cukorkoncentrációk mellett a folyamat eszkalációja a glikációs végtermékek (advanced glycation end products- AGEs) felszaporodásához vezet [15]. A természetes öregedés folyamán fiziológiásan is megjelennek az AGE-ok, de diabetesben ez szignifikánsan felgyorsul és szerepet játszik a szövödmények kialakításában [151]. A bőrben a proinflammatorikus útvonalat erősítik, a keratinocitákat és fibroblastok antiproliferatív és proapoptotikus irányba terelik, kollagén glikációt, keresztkötések kialakulását okozzák és az új szabályos kollagén felépítését hátráltatják [12]. Több, a bőrben felszaporodó, AGE, mint a pentozidin, pirrolin, N-carboximetil-lizin endogén kromofórként viselkedik, így autofluoreszcenciájuk nemlineáris mikroszkópiával mérhető. Ugyanakkor az AGE-ok csak egy része mérhető ezzel a módszerrel, mivel egyes aminosavakkal, mint például a triptofán, átfedést mutat a gerjesztési spektrumuk [79]. Ennek ellenére mérésük ma már klinikailag is alkalmas a cardiovascularis kockázat felbecslésére [15]. Mivel az elhízás és diabetes következtében létrejövő bőrkötőszöveti változások molekuláris biológiai hátterét már részletesen leírták, azt a célt tűztük ki, hogy ezeket *in vivo* is demonstráljuk nemlineáris mikroszkópiával. A különböző diétákon tartott egerek között már 12 hét elteltével szignifikáns súlykülönbséget találtunk. A legnagyobb súlygyarapodást a HFat csoportban észleltük, de nem sokkal maradt el tőle a

HFHF csoport sem. Érdekes módon a magas fruktóz tartalmú vízzel itatott egerek nem mutattak szignifikáns súlygyarapodást a kontrolcsoporthoz képest. Annak háttérében, hogy a HFHF csoport súlya elmaradt a HFat-tól, illetve, hogy a HFru csoport nem hízott meg, azt feltételeztük, hogy a cukros víz jóllakottság érzést kelthetett és csökkentette az egerek étvágyát. Másik kísérleti felállásban sem sikerült kutatóknak magas glükóz tartalmú diétával obesitást elérni [137], így arra következtethetünk, hogy az elhízáshoz feltétlenül szükség van viszonylag magasarányú zsírbevitelre is. A HFat csoport közel megkétszerezte a súlyát a kontrolhoz képest és ezzel együtt az SHG értéke is szignifikánsan alacsonyabb volt. A kísérlet végén *ex vivo* CARS technikát alkalmaztunk, mely a zsírsejtek kifejezett növekedését mutatta. A szövettani elemzés megerősítette észleléseinket, miszerint szignifikánsan vékonyabb dermist és nagyobb zsírsejteket láttunk az elhízott egerekben. A HFHF csoportban, hasonlóan a HFat-hez, szignifikánsan nagyobb súlynövekedést és SHG intenzitás csökkenést találtunk a kontrolhoz képest. Az adipocita növekedést CARS technikával is demonstráltuk. Eredményeinket a szövettani elemzés itt is megerősítette. Ugyanakkor minden érték tekintetében alulmaradtak a HFat csoporthoz képest. A HFru csoportban ezekkel ellentétben nem volt szignifikáns súly, illetve zsírsejtméret növekedés. Az SHG intenzitás azonban ezzel együtt is csökkent. Bár a szövettani vizsgálatkor szignifikáns dermis elvékonyodást nem láttunk, a szakadozott kollagénszerkezet a kötőszöveti károsodást megerősítette. Feltételezésünk szerint ebben a csoportban a másik kettőtől eltérően, leginkább a glikáció állhat az eltérések háttérében. A méréseink során azt a következtetést vontuk le, hogy az általunk használt berendezés alkalmas az obesitashoz és szöveti glikációhoz kapcsolódó kollagénelterések korai észlelésére. Szenzitivitása és specificitása akár *in vivo* klinikai diagnosztikára is alkalmassá teszi. Ugyanakkor a rendszer korlátait is megtapasztaltuk, mivel az intenzív szőrnövekedési fázisokban rosszabb minőségű jelet láttunk. Emellett a CARS technikát továbbra is csak *ex vivo* tudtuk alkalmazni a zsírszöveti mélység leképzésére. Ráadásul mivel két lézerefényforrás összehangolt működésén alapul a rendszer, így az előforduló teljesítményingadozások is befolyásolhatják a képalkotás minőségét. Az egereken végzett kísérleteink célja hosszabb távon az, hogy egy klinikai diagnosztikában is alkalmazható, betegágy melletti, kézben tartható vizsgálófejjel rendelkező eszközzé váljon a jelenlegi Yb- szállézer alapú rendszerünk [29]. Korábban obes egerek viscerális zsírszövetének vizsgálatával előrevetítették, hogy a CARS, TPEF és SHG technikák hatékonyan

kiegészíthetik a biokémiai vizsgálatokat az adipociták funkcióinak tanulmányozásakor [152]. Karsten König és munkatársai pedig már *in vivo* vizsgáltak egészséges és beteg humán bőrmintákat a saját kombinált TPEF/ CARS rendszerükkel. A subcutan rétegek látótérbe hozása korábban nekik sem sikerült, de eredményesen észlelték az epidermalis lipid barrier defektusokat [23]. Eddig viszonylag kevés, nagy elemszámú, klinikai vizsgálatot végeztek kombinált TPEF, SHG és CARS készülékekkel. Ugyanakkor ezek száma növekszik, mivel egy dinamikusan fejlődő és ígéretes képalkotási módszerről van szó [153].

A harmadik hosszú távú vizsgálatunk során már definitív obesitasban szenvedő, magas zsírtartalmú diétával táplált egereket vizsgáltunk azonos korú és nemű, de normál testsúlyú kontrolállatokkal összevetve. A különböző tápokkal etetett egércsoportoknál 8 hetes önkéntes testmozgást vezettünk be. Célunk a bőr kollagénszerkezetének vizsgálata és követése volt a 8 hetes testmozgással töltött időszak előtt és után. Ismert, hogy a fizikai aktivitás csökkenti az obesitas, metabolikus szindróma és diabetes szövődésének kockázatát [72, 154]. Ezt több állatkísérlettel is alátámasztották, de meg kell jegyeznünk, hogy gyakran fiatal állatokat vizsgáltak, holott valójában ezek a kórképek inkább idősebb korban okoznak problémát [155]. Kawanishi és mtsai. bizonyították, hogy a 16 héten keresztül, napi 60 percig alkalmazott futópados testmozgás szignifikánsan csökkentette a neutrofilek és makrofágok számát, továbbá az MCP-1, TNF-alfa, IL-6 és IL-8 gyulladáscsökkentő citokinek szintjét a magas zsírtartalmú diétán tartott egerek viscerális zsírszövetében [11]. A korábbiakban tárgyaltak szerint, a subcutan zsírszöveti proinflammatorikus folyamatok fontos szerepet játszanak a kötőszöveti átépülésben és ezáltal a bőrgyógyászati következmények kialakulásában. Zhang és mtsai. ezt egér modellen is bizonyították, mivel elhízott C57BL/6 háttérű egerek esetében kifehélyesedéssel járó bőrelváltozások magasabb előfordulását figyelték meg. A magas zsírtartalmú diéta hatására stimulálódó és bőrbe vándorló CD11+ makrofágok fokozott IL-1 β és IL-18 termelése háttérben az epidermalis zsírsavkötő fehérje fokozott kifejeződését véleményezték [18]. Kísérletünk során, nem figyeltünk meg hasonló ulceratív folyamatokat, melyet azonban a kísérleti felállás különbözősége is magyarázhat. Az idézett kísérletben 60% zsírtartalmú tápot kaptak az egerek és 9 hónapig tarott a megfigyelésük. A kísérlet során genetikailag módosított egértörzset is alkalmaztak, de a spontán fekélyképződés a vad típusú obes egereken is előfordult. Ezzel szemben mi csak

30% zsírtartalmú tápot adtunk 8 hónapig, majd önkéntes testmozgást vezettünk be, mely megakadályozhatta a bőrelváltozások kialakulását a proinflammatorikus folyamatok csökkentése révén. Ezt a feltevést alátámaszthatja az a kísérlet is, mely szerint 18 hónapos, azaz idősnek mondható Balb/C egerek esetében napi 30 perc fizikai aktivitás hatására gyorsult sebgyógyulási hajlamot találtak [156]. Ugyanezt bizonyították 22 hetes, tehát fiatal, de magas zsírtartalmú diétával táplált egerek esetében is [157]. További érdekes irodalmi adat, hogy 22 hónapos C57BL/6 egerek esetében 33 napon keresztül alkalmazott, napi egy órás testmozgás hatására az MCP-1 és IL-6 gyulladást okozó citokinek szintje csökkent és emellett a bőrszerkezetük minősége javult. A dermis kollagéntartama megnőtt, az epidermisük stratum spinosum pedig kiszélesedett. A sport jótékony hatásának hátterében az AMP aktivált protein kináz dependens faktor felszabadulását véleményezték, mely az izomból szekretálódva lassíthatja a bőr öregedési folyamatait [158].

A harmadik kísérletünk kezdetén a HF csoportban szignifikánsan alacsonyabb *in vivo* SHG intenzitást, továbbá szignifikánsan nagyobb zsírsejteket és SAT vastagságot találtunk. Ez megegyezett a korábbi kísérleteinkben látottakkal. Az obes egerek dermise elvékonyodott, de ez nem mutatott szignifikanciát a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a látott szerkezeti eltérések kvantifikálásaként egy új módszer segítségével meghatároztuk a WvG festett metszeteken látható kollagén denzitását. Ezzel a kiértékeléssel szignifikánsan alacsonyabb értéket kaptunk a HF csoportban a kontrollhoz képest. A fentiekben leírt irodalmi háttér alapján azt vártuk, hogy az önkéntes sport hatására a HF csoportban látott eltérések javulást mutatnak. Mivel elsődlegesen a sport hatására voltunk kíváncsiak, így az egerek diétáin nem változtattunk. Ezzel együtt is egy szignifikáns fogyást észleltünk a 8-ik hét végére. Amikor már nem láttunk lényegi különbséget az egercsoportok átlagos súlyai között, ismételt SHG és szövettani vizsgálatot végeztünk. A sport hatására a korábban obes egerek zsírsejtméretei csökkentek, kollagén denzitásuk és SHG értékük szignifikánsan javult. A kontrolcsoporthoz képest egyik érékben sem találtunk már érdemi eltérést. Az irodalmi adatokkal összhangban, arra a következtetésre jutottunk, hogy a testmozgás hatására érdemi kötőszövet szerkezeti javulás következett be, melyet sikeresen tudtunk *in vivo* SHG technikával demonstrálni [32].

6. Következtetések

Kísérleteink eredményei alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

I. kísérlet:

- Sikeresen alkalmaztuk saját fejlesztésű, nemlineáris mikroszkópiára alkalmas eszközünket *in vivo* SHG mérések kivitelezésére. Megállapítottuk, hogy az *in vivo* SHG mérés megfelelően szenzitív a kollagénszerkezet eltéréseinek vizsgálatára, és már a korai károsodások értékelésére is alkalmas.
- Az SHG technikát stabilnak és minőségi képek felvételére alkalmasnak találtuk, így arra következtettünk, hogy a közeljövőben az alap kutatás mellett klinikai diagnosztikára is alkalmassá válhat.
- A CARS rendszer nem volt alkalmas *in vivo* mérésekre, mivel a subcutan zsírszövet látótérbe hozását csak akkora energiával lehetne elérni, amely már szövetkárosodást okozna.
- A kísérlet során azonosítani tudtuk az obesitasra jellemző bőrkötőszöveti változásokat. A genetikailag hízásra hajlamos egerekben kalóriamegszorítás mellett nem észleltünk érdemi súlynövekedést és kollagénkárosodást. Ebből arra következtettünk, hogy elsődlegesen az életmód, nem pedig a genetikai háttér felelt az elhízásért és annak következményeiért.

II. kísérlet:

- Ismét sikerrel alkalmaztuk az *in vivo* SHG technikát a kollagénszerkezet eltéréseinek vizsgálatára, és a korai károsodások értékelésére. A CARS módszert azonban továbbra is csak *ex vivo* tudtuk alkalmazni.
- HFat és HFHF diétákkal jelentős elhízást tudtunk indukálni vad típusú egereken, mely megerősítette az életmód szerepét az obesitas kialakulásában.
- A legnagyobb súlygyarapodást a HFat csoportban észleltük. Ehhez képest a HFHF csoport testsúlyátlagai alacsonyabbak voltak. A HFru csoport a cukorbevitel ellenére nem hízott. Ezek háttérében a fruktóz tartalmú ivóvíz étvágycsökkentő hatását feltételeztük. Mivel irodalmi adatok alapján, korábbi

kísérletekben sem sikerült magas glükóz tartalmú diétával obesitast indukálni, arra következtethetünk, hogy az elhízáshoz szükséges a magasabb arányú zsírbevitel is.

- A HFat és HFHF csoportokban az SHG jel csökkenés hátterében az obesitas negatív hatásait véleményeztük. A HFru csoportban érdemi súly és zsírsejtméret változás nélkül is szignifikánsan csökkent SHG jelet találtunk. Ebből arra következtettünk, hogy a kollagénszerkezet romlásának hátterében a glikáció is fontos szerepet játszhatott.
- A méréseink során azt a következtetést vontuk le, hogy az általunk használt berendezés alkalmas az obesitashoz és szöveti glikációhoz kapcsolódó kollagéneltérések korai észlelésére. Szenszitivitása és specificitása *in vivo* diagnosztikára alkalmassá teszi.

III. kísérlet:

- A korábbi kísérleteinkkel megegyezően szignifikánsan nagyobb zsírsejteket és subcutan zsírszövetet, továbbá csökkent kollagén denzitást és SHG jelet találtunk *in vivo* és *ex vivo* egyaránt. Ismét sikerült kimutatni és követni a kollagénszerkezet változását *in vivo* SHG technikával.
- 8 hetes önkéntes testmozgás bevezetése után szignifikáns súlycsökkenést észleltünk az elhízott csoportban. Mivel a korábban alkalmazott diétán nem változtattunk, arra a következésre jutottunk, hogy a sportnak kiemelkedő szerepe van a testsúlykontrollban.
- A sport hatására a korábban obes egerek zsírsejtméretei csökkentek, kollagén denzitásuk és SHG értékük szignifikánsan javult. A kontrolcsoporthoz képest egyik értékben sem találtunk érdemi eltérést a 8 hetes kísérleti periódus végén. Az irodalmi adatokkal összhangban, arra a következtetésre jutottunk, hogy a testmozgás hatására a kötőszövet szerkezetében érdemi javulás következett be, melyet sikeresen tudtunk *in vivo* SHG technikával demonstrálni.
- Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy megfelelő életmódváltás esetén a bőr nagy regeneratív potenciállal rendelkezik. Ezért sosem késő a megfelelő testmozgás elkezdése, mely az obesitas és diabetes bőrgyógyászati, valamint általános szövödményeinek kockázatát is csökkenti.

7. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben a nemlineáris mikroszkópia fejlődése olyan nem invazív képalkotó módszerek kifejlesztéséhez vezetett, mint a másod harmonikus keltés (SHG) és a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS). Ezek a technikák lehetővé teszik a bőr mélyebb rétegeinek nagy felbontású képalkotását endogén kromofórok, mint például a kollagén és elasztin gerjesztésével, vagy a lipidek CH kötés rezgéseinek vizualizációjával. Kutatócsoportunk egy konzorciumi projektben való közreműködés során részt vett egy hazai fejlesztésű, *in vivo* képalkotásra alkalmas, biztonságos és innovatív nemlineáris mikroszkóp fejlesztésében [28, 29]. A növekvő incidenciájú elhízás, metabolikus szindróma és cukorbetegség súlyos bőrgyógyászati szövődményekhez, például kötőszöveti átépüléshez, fekélyes bőrelváltozásokhoz és sebgyógyulási zavarokhoz vezethet. Kísérleteink során az elhízás és a testmozgás általi súlycsökkenés bőr kötőszövetre gyakorolt hatásait vizsgáltuk *in vivo* nemlineáris mikroszkópiával, egérmodelleken.

Nemlineáris mikroszkópiával kimutattuk, hogy az *ad libitum* táplált ob / ob mutáns egerek gyors súlygyarapodása bőr kötőszöveti károsodáshoz, valamint a zsírsejtek méretnövekedéséhez vezet [30]. Ezt követően különböző diéták hatásait vizsgáltuk vad típusú egerek súly- és következményes bőr kötőszöveti változásaival kapcsolatban. Az egereket magas zsír-, magas fruktóz-, vagy magas zsír és fruktóz tartalmú étrenden tartottuk. Az első kísérlethez hasonlóan szoros összefüggést találtunk az egerek súly- és zsírsejtnövekedése, valamint az ehhez kapcsolódó, kollagén károsodásra utaló, *in vivo* SHG intenzitás csökkenése között [31].

A mozgásszegény életmód miatti súlyfelesleg csökkenthető a fizikai aktivitás növelésével. A testmozgás bőrszerkezetre gyakorolt hatásának követése során vad típusú elhízott egereket vizsgáltunk. A kísérlet során taposómalomban végzett, napi rendszerességű testmozgást vezettünk be a 2 hónapos vizsgálati időszak alatt. A vizsgálat elején a kollagénszerkezet károsodását nemlineáris mikroszkópiával bizonyítottuk, mely szignifikánsan javult a kísérleti időszak végére. *In vivo* nemlineáris mikroszkópia segítségével bizonyítani tudtuk a bőr kötőszöveti károsodás reverzibilitását, melyet a testmozgás kedvező hatásának tartottunk [32].

8. Summary

In the last two decades, advances in nonlinear microscopy has led to the development of noninvasive imaging methods, such as second harmonic generation (SHG) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS). These techniques allow high-resolution imaging of deeper layers of the skin by excitation of chromophores such as collagen and elastin or visualization of CH bond resonance in lipids. Our research group participated in a consortium where an innovative and safe device was developed, which is capable of *in vivo* nonlinear imaging [28, 29]. Obesity related metabolic syndrome and diabetes lead to severe dermatological complications such as connective tissue changes, ulcerative skin lesions and delayed wound healing. For this reason, in our experiments we investigated the effects of weight change on dermal collagen alterations and adipocyte enlargement in murine models by *in vivo* nonlinear microscopy.

We demonstrated that rapid weight gain of ad libitum fed ob/ob mutant mice lead to connective tissue impairment along with enlargement of the adipose tissue [30]. Furthermore, we aimed to mimic the effects of various diet types on weight and consequential skin changes in wild type mice. Mice were kept on either a high-fat or a high-fructose or a high-fat and high-fructose containing diet. Similarly, a strong correlation was found between the body weight and adipocyte sizes. We saw that SHG intensity of dermal collagen decreases considerably with weight gain [31].

Excess bodyweight due to sedentary lifestyle could be reduced by increasing one's physical activity. To investigate the effects of physical exercise on the skin structure, we established an experimental setup in which high-fat fed wild type obese mice performed voluntary exercise in a hamster wheel for two months. Impaired collagen structure, revealed by nonlinear microscopy, improved significantly after physical activity was introduced. Utilizing nonlinear microscopy, we could prove the reversibility of the connective tissue deterioration as an advantage of physical exercise [32].

9. Irodalomjegyzék

1. Kopelman, P.G. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*. **404**(6778): p. 635-43.
2. Federation, I.D. IDF WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME. 2005; Available from: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
3. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz. (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. **287**(3): p. 356-9.
4. Grundy, S.M., J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C. Smith, Jr., J.A. Spertus, and F. Costa. (2006) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr Opin Cardiol*. **21**(1): p. 1-6.
5. Kaur, J. (2014) A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. **2014**: p. 943162.
6. Mirmirani, P. and D.M. Carpenter. (2014) Skin disorders associated with obesity in children and adolescents: a population-based study. *Pediatr Dermatol*. **31**(2): p. 183-90.
7. Shipman, A.R. and G.W. Millington. (2011) Obesity and the skin. *Br J Dermatol*. **165**(4): p. 743-50.
8. Yosipovitch, G., A. DeVore, and A. Dawn. (2007) Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol*. **56**(6): p. 901-16; quiz 917-20.
9. Reiber, G.E. (2002) Epidemiology of diabetic foot ulcers and amputation: evidence for prevention. *The Evidence Base for Diabetes Care*. (641-665).
10. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman. (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell*. **156**(1-2): p. 20-44.
11. Kawanishi, N., H. Niihara, T. Mizokami, K. Yada, and K. Suzuki. (2015) Exercise training attenuates neutrophil infiltration and elastase expression in adipose tissue of high-fat-diet-induced obese mice. *Physiol Rep*. **3**(9).
12. Gkogkolou, P. and M. Bohm. (2012) Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol*. **4**(3): p. 259-70.

13. Ezure, T. and S. Amano. (2010) Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol.* **19**(10): p. 878-82.
14. Ezure, T. and S. Amano. (2011) Negative regulation of dermal fibroblasts by enlarged adipocytes through release of free fatty acids. *J Invest Dermatol.* **131**(10): p. 2004-9.
15. Yamagishi, S., K. Fukami, and T. Matsui. (2015) Evaluation of tissue accumulation levels of advanced glycation end products by skin autofluorescence: A novel marker of vascular complications in high-risk patients for cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* **185**: p. 263-8.
16. Bastien, M., P. Poirier, I. Lemieux, and J.P. Despres. (2014) Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* **56**(4): p. 369-81.
17. Cao, H. (2014) Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* **220**(2): p. T47-59.
18. Zhang, Y., Q. Li, E. Rao, Y. Sun, M.E. Grossmann, R.J. Morris, M.P. Cleary, and B. Li. (2015) Epidermal Fatty Acid binding protein promotes skin inflammation induced by high-fat diet. *Immunity.* **42**(5): p. 953-64.
19. Ezure, T. and S. Amano. (2015) Increment of subcutaneous adipose tissue is associated with decrease of elastic fibres in the dermal layer. *Exp Dermatol.* **24**(12): p. 924-9.
20. Ezure, T., J. Hosoi, S. Amano, and T. Tsuchiya. (2009) Sagging of the cheek is related to skin elasticity, fat mass and mimetic muscle function. *Skin Res Technol.* **15**(3): p. 299-305.
21. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* **248**(4951): p. 73-6.
22. Breunig, H.G., H. Studier, and K. Konig. (2010) Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo. *Opt Express.* **18**(8): p. 7857-71.
23. Breunig, H.G., R. Buckle, M. Kellner-Hofer, M. Weinigel, J. Lademann, W. Sterry, and K. Konig. (2012) Combined in vivo multiphoton and CARS imaging of healthy and disease-affected human skin. *Microsc Res Tech.* **75**(4): p. 492-8.

24. Han, M., G. Giese, and J. Bille. (2005) Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Opt Express*. **13**(15): p. 5791-7.
25. Kolonics, A., Z. Csiszovszki, E.R. Toke, O. Lorincz, D. Haluszka, and R. Szipocs. (2014) In vivo study of targeted nanomedicine delivery into Langerhans cells by multiphoton laser scanning microscopy. *Exp Dermatol*. **23**(8): p. 596-605.
26. Bognar, P., I. Nemeth, B. Mayer, D. Haluszka, N. Wikonkal, E. Ostorhazi, S. John, M. Paulsson, N. Smyth, M. Pasztoi, E.I. Buzas, R. Szipocs, A. Kolonics, E. Temesvari, and S. Karpati. (2014) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*. **134**(1): p. 105-11.
27. Lorincz, K., A. Banvolgyi, D. Haluszka, N. Gyongyosi, R. Szipocs, D. Marton, M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, S. Karpati, and N.M. Wikonkal. (2014) Analysis of photoaging in mice with impaired epidermal antioxidant defense using in vivo multiphoton microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*. **134**: p. S84-S84.
28. Haluszka, D., K. Lorincz, R. Szipocs, N. Gyongyosi, A. Banvalgyi, A. Keszeg, S. Karpati, and N.M. Wikonkal. (2014) In vivo assessment of potential carcinogenicity of multi-photon microscopy as the function of wavelength in the near-infrared range. *Journal of Investigative Dermatology*. **134**: p. S86-S86.
29. Krolopp, Á., A. Csákányi, D. Haluszka, D. Csáti, L. Vass, A. Kolonics, N. Wikonkál, and R. Szipócs. (2016) Handheld nonlinear microscope system comprising a 2 MHz repetition rate, mode-locked Yb-fiber laser for in vivo biomedical imaging. *Biomedical Optics Express*. **7**(9): p. 3531.
30. Haluszka, D., K. Lorincz, G. Molnar, G. Tamas, A. Kolonics, R. Szipocs, S. Karpati, and N.M. Wikonkal. (2015) In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-stokes raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser-based CARS extension unit. *Microsc Res Tech*. **78**(9): p. 823-30.
31. Haluszka, D., K. Lőrincz, N. Kiss, R. Szipócs, E. Kuroli, N. Gyöngyösi, and N.M. Wikonkál. (2016) Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy. *Biomedical Optics Express*. **7**(11): p. 4480-4489.

32. Lorincz, K., D. Haluszka, N. Kiss, N. Gyongyosi, A. Banvolgyi, R. Szipocs, and N.M. Wikonkal. (2017) Voluntary exercise improves murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity. *Arch Dermatol Res.* **309**(3): p. 209-215.
33. Thomas, D.M., M. Weedermann, B.F. Fuemmeler, C.K. Martin, N.V. Dhurandhar, C. Bredlau, S.B. Heymsfield, E. Ravussin, and C. Bouchard. (2014) Dynamic model predicting overweight, obesity, and extreme obesity prevalence trends. *Obesity (Silver Spring).* **22**(2): p. 590-7.
34. Ogden, C.L., M.D. Carroll, B.K. Kit, and K.M. Flegal. (2014) Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA.* **311**(8): p. 806-14.
35. Flegal, K.M., D. Kruszon-Moran, M.D. Carroll, C.D. Fryar, and C.L. Ogden. (2016) Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA.* **315**(21): p. 2284-91.
36. Rurik, I., T. Ungvari, J. Szidor, P. Torzsa, C. Moczar, Z. Jancso, and J. Sandor. (2016) [Obese Hungary. Trend and prevalence of overweight and obesity in Hungary, 2015]. *Orv Hetil.* **157**(31): p. 1248-55.
37. Prospective Studies, C., G. Whitlock, S. Lewington, P. Sherliker, R. Clarke, J. Emberson, J. Halsey, N. Qizilbash, R. Collins, and R. Peto. (2009) Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* **373**(9669): p. 1083-96.
38. van der Klaauw, A.A. and I.S. Farooqi. (2015) The hunger genes: pathways to obesity. *Cell.* **161**(1): p. 119-32.
39. Coleman, D.L. (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* **9**(4): p. 294-8.
40. Conde, J., M. Scotece, R. Gomez, V. Lopez, J.J. Gomez-Reino, F. Lago, and O. Gualillo. (2011) Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors.* **37**(6): p. 413-20.
41. Chen, H., O. Charlat, L.A. Tartaglia, E.A. Woolf, X. Weng, S.J. Ellis, N.D. Lakey, J. Culpepper, K.J. Moore, R.E. Breitbart, G.M. Duyk, R.I. Tepper, and J.P. Morgenstern. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor:

- identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. **84**(3): p. 491-5.
42. Martin, K.A., M.V. Mani, and A. Mani. (2015) New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*. **763**(Pt A): p. 64-74.
 43. Benzinou, M., J.W. Creemers, H. Choquet, S. Lobbens, C. Dina, E. Durand, A. Guerardel, P. Boutin, B. Jouret, B. Heude, B. Balkau, J. Tichet, M. Marre, N. Potoczna, F. Horber, C. Le Stunff, S. Czernichow, A. Sandbaek, T. Lauritzen, K. Borch-Johnsen, G. Andersen, W. Kiess, A. Korner, P. Kovacs, P. Jacobson, L.M. Carlsson, A.J. Walley, T. Jorgensen, T. Hansen, O. Pedersen, D. Meyre, and P. Froguel. (2008) Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet*. **40**(8): p. 943-5.
 44. Meyre, D., J. Delplanque, J.C. Chevre, C. Lecoeur, S. Lobbens, S. Gallina, E. Durand, V. Vatin, F. Degraeve, C. Proenca, S. Gaget, A. Korner, P. Kovacs, W. Kiess, J. Tichet, M. Marre, A.L. Hartikainen, F. Horber, N. Potoczna, S. Hercberg, C. Levy-Marchal, F. Pattou, B. Heude, M. Tauber, M.I. McCarthy, A.I. Blakemore, A. Montpetit, C. Polychronakos, J. Weill, L.J. Coin, J. Asher, P. Elliott, M.R. Jarvelin, S. Visvikis-Siest, B. Balkau, R. Sladek, D. Balding, A. Walley, C. Dina, and P. Froguel. (2009) Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet*. **41**(2): p. 157-9.
 45. Farooqi, I.S. (2008) Monogenic human obesity. *Front Horm Res*. **36**: p. 1-11.
 46. Farooqi, S. (2007) Insights from the genetics of severe childhood obesity. *Horm Res*. **68 Suppl 5**: p. 5-7.
 47. Nogueiras, R., P. Wiedmer, D. Perez-Tilve, C. Veyrat-Durebex, J.M. Keogh, G.M. Sutton, P.T. Pfluger, T.R. Castaneda, S. Neschen, S.M. Hofmann, P.N. Howles, D.A. Morgan, S.C. Benoit, I. Szanto, B. Schrott, A. Schurmann, H.G. Joost, C. Hammond, D.Y. Hui, S.C. Woods, K. Rahmouni, A.A. Butler, I.S. Farooqi, S. O'Rahilly, F. Rohner-Jeanrenaud, and M.H. Tschop. (2007) The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest*. **117**(11): p. 3475-88.
 48. Krude, H., H. Biebermann, D. Schnabel, M.Z. Tansek, P. Theunissen, P.E. Mullis, and A. Gruters. (2003) Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new

- cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(10): p. 4633-40.
49. Gropp, E., M. Shanabrough, E. Borok, A.W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, L. Plum, N. Balthasar, B. Hampel, A. Waisman, G.S. Barsh, T.L. Horvath, and J.C. Bruning. (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.* **8**(10): p. 1289-91.
 50. Laakso, M. (2004) Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* **15**(2): p. 115-20.
 51. Church, C., L. Moir, F. McMurray, C. Girard, G.T. Banks, L. Teboul, S. Wells, J.C. Bruning, P.M. Nolan, F.M. Ashcroft, and R.D. Cox. (2010) Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* **42**(12): p. 1086-92.
 52. Frayling, T.M., N.J. Timpson, M.N. Weedon, E. Zeggini, R.M. Freathy, C.M. Lindgren, J.R. Perry, K.S. Elliott, H. Lango, N.W. Rayner, B. Shields, L.W. Harries, J.C. Barrett, S. Ellard, C.J. Groves, B. Knight, A.M. Patch, A.R. Ness, S. Ebrahim, D.A. Lawlor, S.M. Ring, Y. Ben-Shlomo, M.R. Jarvelin, U. Sovio, A.J. Bennett, D. Melzer, L. Ferrucci, R.J. Loos, I. Barroso, N.J. Wareham, F. Karpe, K.R. Owen, L.R. Cardon, M. Walker, G.A. Hitman, C.N. Palmer, A.S. Doney, A.D. Morris, G.D. Smith, A.T. Hattersley, and M.I. McCarthy. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* **316**(5826): p. 889-94.
 53. Loos, R.J., C.M. Lindgren, S. Li, E. Wheeler, J.H. Zhao, I. Prokopenko, M. Inouye, R.M. Freathy, A.P. Attwood, J.S. Beckmann, S.I. Berndt, L.C. Prostate, T. Ovarian Cancer Screening, K.B. Jacobs, S.J. Chanock, R.B. Hayes, S. Bergmann, A.J. Bennett, S.A. Bingham, M. Bochud, M. Brown, S. Cauchi, J.M. Connell, C. Cooper, G.D. Smith, I. Day, C. Dina, S. De, E.T. Dermitzakis, A.S. Doney, K.S. Elliott, P. Elliott, D.M. Evans, I. Sadaf Farooqi, P. Froguel, J. Ghorri, C.J. Groves, R. Gwilliam, D. Hadley, A.S. Hall, A.T. Hattersley, J. Hebebrand, I.M. Heid, Kora, C. Lamina, C. Gieger, T. Illig, T. Meitinger, H.E. Wichmann, B. Herrera, A. Hinney, S.E. Hunt, M.R. Jarvelin, T. Johnson, J.D. Jolley, F. Karpe, A. Keniry, K.T. Khaw, R.N. Luben, M. Mangino, J. Marchini, W.L. McArdle, R. McGinnis, D. Meyre, P.B. Munroe, A.D. Morris, A.R. Ness, M.J. Neville, A.C.

- Nica, K.K. Ong, S. O'Rahilly, K.R. Owen, C.N. Palmer, K. Papadakis, S. Potter, A. Pouta, L. Qi, S. Nurses' Health, J.C. Randall, N.W. Rayner, S.M. Ring, M.S. Sandhu, A. Scherag, M.A. Sims, K. Song, N. Soranzo, E.K. Speliotes, I. Diabetes Genetics, H.E. Syddall, S.A. Teichmann, N.J. Timpson, J.H. Tobias, M. Uda, N.I.A.S. Sardi, C.I. Vogel, C. Wallace, D.M. Waterworth, M.N. Weedon, C. Wellcome Trust Case Control, C.J. Willer, Fusion, Wraight, X. Yuan, E. Zeggini, J.N. Hirschhorn, D.P. Strachan, W.H. Ouwehand, M.J. Caulfield, N.J. Samani, T.M. Frayling, P. Vollenweider, G. Waeber, V. Mooser, P. Deloukas, M.I. McCarthy, N.J. Wareham, I. Barroso, K.B. Jacobs, S.J. Chanock, R.B. Hayes, C. Lamina, C. Gieger, T. Illig, T. Meitinger, H.E. Wichmann, P. Kraft, S.E. Hankinson, D.J. Hunter, F.B. Hu, H.N. Lyon, B.F. Voight, M. Ridderstrale, L. Groop, P. Scheet, S. Sanna, G.R. Abecasis, G. Albai, R. Nagaraja, D. Schlessinger, A.U. Jackson, J. Tuomilehto, F.S. Collins, M. Boehnke and K.L. Mohlke. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* **40**(6): p. 768-75.
54. Bougneres, P., L. Pantalone, A. Linglart, A. Rothenbuhler, and C. Le Stunff. (2008) Endocrine manifestations of the rapid-onset obesity with hypoventilation, hypothalamic, autonomic dysregulation, and neural tumor syndrome in childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* **93**(10): p. 3971-80.
55. Despres, J.P., S. Moorjani, P.J. Lupien, A. Tremblay, A. Nadeau, and C. Bouchard. (1990) Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis.* **10**(4): p. 497-511.
56. Liu, J., C.S. Fox, D.A. Hickson, W.D. May, K.G. Hairston, J.J. Carr, and H.A. Taylor. (2010) Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**(12): p. 5419-26.
57. Kennedy, A., K. Martinez, C.C. Chuang, K. LaPoint, and M. McIntosh. (2009) Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr.* **139**(1): p. 1-4.
58. Manna, P. and S.K. Jain. (2015) Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* **13**(10): p. 423-44.

59. Ouchi, N., J.L. Parker, J.J. Lugus, and K. Walsh. (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* **11**(2): p. 85-97.
60. Boden, G. and X. Chen. (1995) Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* **96**(3): p. 1261-8.
61. Li, S., H.J. Shin, E.L. Ding, and R.M. van Dam. (2009) Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* **302**(2): p. 179-88.
62. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield. (2003) C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* **111**(12): p. 1805-12.
63. Jung, U.J. and M.S. Choi. (2014) Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* **15**(4): p. 6184-223.
64. Lam, D.W. and D. LeRoith. (2000) Metabolic Syndrome, in *Endotext*, L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, and A. Vinik, Editors: South Dartmouth (MA).
65. Park, Y.W., S. Zhu, L. Palaniappan, S. Heshka, M.R. Carnethon, and S.B. Heymsfield. (2003) The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* **163**(4): p. 427-36.
66. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw. (2006) Metabolic syndrome--a new worldwide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* **23**(5): p. 469-80.
67. Moran, A., H.J. Zhang, L.K. Olson, J.S. Harmon, V. Poitout, and R.P. Robertson. (1997) Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *J Clin Invest.* **99**(3): p. 534-9.
68. Petersen, K.F., S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia, and G.I. Shulman. (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* **350**(7): p. 664-71.

69. Kushner, R.F. and D.H. Ryan. (2014) Assessment and lifestyle management of patients with obesity: clinical recommendations from systematic reviews. *Jama*. **312**(9): p. 943-52.
70. Guthrie, R.A. and D.W. Guthrie. (2004) Pathophysiology of diabetes mellitus. *Crit Care Nurs Q*. **27**(2): p. 113-25.
71. (2016) Standards of Medical Care in Diabetes-2016: Summary of Revisions. *Diabetes Care*. **39 Suppl 1**: p. S4-5.
72. Teixeira-Lemos, E., S. Nunes, F. Teixeira, and F. Reis. (2011) Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol*. **10**: p. 12.
73. Milic, S., D. Lulic, and D. Stimac. (2014) Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*. **20**(28): p. 9330-7.
74. Ortega, F.B., C.J. Lavie, and S.N. Blair. (2016) Obesity and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. **118**(11): p. 1752-70.
75. Arslan, N. (2014) Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol*. **20**(44): p. 16452-63.
76. Dorrance, A.M., N. Matin, and P.W. Pires. (2014) The effects of obesity on the cerebral vasculature. *Curr Vasc Pharmacol*. **12**(3): p. 462-72.
77. De Pergola, G. and F. Silvestris. (2013) Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. **2013**: p. 291546.
78. Chambers, T.J. and R.A. Richard. (2015) The impact of obesity on male fertility. *Hormones (Athens)*. **14**(4): p. 563-8.
79. Lutgers, H.L., R. Graaff, T.P. Links, L.J. Ubink-Veltmaat, H.J. Bilo, R.O. Gans, and A.J. Smit. (2006) Skin Autofluorescence as a Noninvasive Marker of Vascular Damage in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. **29**(12): p. 2654-2659.
80. Gyöngyösi Nóra, L.K.K., Mihály Emese, Herszényi László, Tulassay Zsolt, Wikonkál Norbert. (2015) A gyulladásoos bélbetegségek immunszuppresszív és anti-TNF-alfa-kezelésének bőrgyógyászati mellékhatásai. *MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM* **68**:(1) pp. 34-45.

81. Schagen, S.K., V.A. Zampeli, E. Makrantonaki, and C.C. Zouboulis. (2012) Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermatoendocrinol.* **4**(3): p. 298-307.
82. Scheinfeld, N.S. (2004) Obesity and dermatology. *Clin Dermatol.* **22**(4): p. 303-9.
83. Falagas, M.E. and M. Kompoti. (2006) Obesity and infection. *The Lancet Infectious Diseases.* **6**(7): p. 438-446.
84. Wenczl, E. (2009) [Skin manifestations, treatment and rehabilitation in overweight and obesity]. *Orv Hetil.* **150**(37): p. 1731-8.
85. Behm, B., S. Schreml, M. Landthaler, and P. Babilas. (2012) Skin signs in diabetes mellitus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **26**(10): p. 1203-11.
86. Lima, A.L., T. Illing, S. Schliemann, and P. Elsner. (2017) Cutaneous Manifestations of Diabetes Mellitus: A Review. *Am J Clin Dermatol.*
87. Van Hattem, S., A.H. Bootsma, and H.B. Thio. (2008) Skin manifestations of diabetes. *Cleve Clin J Med.* **75**(11): p. 772, 774, 776-7 passim.
88. Kárpáti Sarolta, K.L., Remenyik Éva. (2012) *Bőrgyógyászat és venerológia.* Budapest: Medicina Könyvkiadó.
89. Levy, L. and J.A. Zeichner. (2012) Dermatologic manifestation of diabetes. *J Diabetes.* **4**(1): p. 68-76.
90. Rajadhyaksha, M., A. Marghoob, A. Rossi, A.C. Halpern, and K.S. Nehal. (2017) Reflectance confocal microscopy of skin in vivo: From bench to bedside. *Lasers Surg Med.* **49**(1): p. 7-19.
91. Hibler, B.P., Q. Qi, and A.M. Rossi. (2016) Current state of imaging in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* **35**(1): p. 2-8.
92. Cao, T. and H.L. Tey. (2015) High-definition optical coherence tomography - an aid to clinical practice and research in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges.* **13**(9): p. 886-90.
93. Costello, F.E. (2014) Optical coherence tomography technologies: which machine do you want to own? *J Neuroophthalmol.* **34 Suppl**: p. S3-9.
94. Gambichler, T., A. Pljakic, and L. Schmitz. (2015) Recent advances in clinical application of optical coherence tomography of human skin. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* **8**: p. 345-54.

95. Gyongyosi, N., K. Lorincz, D. Haluszka, A. Keszeg, E. Tatrai, J. Nemeth, S. Karpati, and N.M. Wikonkal. (2015) Use of optical coherence tomography as a tool for assessing photosensitivity in mice with various genetic backgrounds. *Journal of Investigative Dermatology*. **135**: p. S83-S83.
96. Mogensen, M., H.A. Morsy, B.M. Nurnberg, and G.B. Jemec. (2008) Optical coherence tomography imaging of bullous diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. **22**(12): p. 1458-64.
97. Schuh, S., J. Holmes, M. Ulrich, L. Themstrup, G.B. Jemec, N. De Carvalho, G. Pellacani, and J. Welzel. (2017) Imaging Blood Vessel Morphology in Skin: Dynamic Optical Coherence Tomography as a Novel Potential Diagnostic Tool in Dermatology. *Dermatol Ther (Heidelb)*.
98. Ulrich, M., L. Themstrup, N. de Carvalho, M. Manfredi, C. Grana, S. Ciardo, R. Kastle, J. Holmes, R. Whitehead, G.B. Jemec, G. Pellacani, and J. Welzel. (2016) Dynamic Optical Coherence Tomography in Dermatology. *Dermatology*. **232**(3): p. 298-311.
99. Mamalis, A., D. Ho, and J. Jagdeo. (2015) Optical Coherence Tomography Imaging of Normal, Chronologically Aged, Photoaged and Photodamaged Skin: A Systematic Review. *Dermatol Surg*. **41**(9): p. 993-1005.
100. Batta, M.M., S.E. Kessler, P.F. White, W. Zhu, and C.A. Fox. (2015) Reflectance confocal microscopy: an overview of technology and advances in telepathology. *Cutis*. **95**(5): p. E39-46.
101. Ulrich, M., S. Lange-Asschenfeldt, and S. Gonzalez. (2012) Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy in dermatology. *G Ital Dermatol Venereol*. **147**(2): p. 171-8.
102. Guitera, P., G. Pellacani, C. Longo, S. Seidenari, M. Avramidis, and S.W. Menzies. (2009) In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol*. **129**(1): p. 131-8.
103. Fink, C. and H.A. Haenssle. (2016) Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Skin Res Technol*.
104. Uribe, P., H. Collgros, R.A. Scolyer, S.W. Menzies, and P. Guitera. (2017) In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnosis of Melanoma and Melanotic Macules of the Lip. *JAMA Dermatol*.

105. Kadouch, D.J., M.M. Leeflang, Y.S. Elshot, C. Longo, M. Ulrich, A.C. van der Wal, A. Wolkerstorfer, M.W. Bekkenk, and M.A. de Rie. (2017) Diagnostic accuracy of confocal microscopy imaging versus punch biopsy for diagnosing and subtyping basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
106. Kadouch, D.J., Y.S. Elshot, B. Zupan-Kajcovski, A.S. van Haersma de With, A.C. van der Wal, M. Leeflang, K. Jozwiak, A. Wolkerstorfer, M.W. Bekkenk, P.I. Spuls, and M.A. de Rie. (2017) One-stop-shop with confocal microscopy imaging versus standard care for surgical treatment of basal cell carcinoma: an open label, non-inferiority, randomized controlled multicenter trial. *Br J Dermatol*.
107. Longo, C., M. Ragazzi, M. Rajadhyaksha, K. Nehal, A. Bennassar, G. Pellacani, and J. Malveyh Guilera. (2016) In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy for Dermatologic and Mohs Surgeons. *Dermatol Clin*. **34**(4): p. 497-504.
108. Hoogedoorn, L., M. Peppelman, P.C. van de Kerkhof, P.E. van Erp, and M.J. Gerritsen. (2015) The value of in vivo reflectance confocal microscopy in the diagnosis and monitoring of inflammatory and infectious skin diseases: a systematic review. *Br J Dermatol*. **172**(5): p. 1222-48.
109. Corcuff, P., G. Gonnord, G.E. Pierard, and J.L. Leveque. (1996) In vivo confocal microscopy of human skin: a new design for cosmetology and dermatology. *Scanning*. **18**(5): p. 351-5.
110. Samhaber, K.T., H.P. Bertsch, M.P. Schön, and H.A. Haenssle. (2017) In vivo reflectance confocal microscopy of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome: a histopathological correlation based on a case series. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. **15**(5): p. 573-576.
111. Levi, A., I. Ophir, N. Lemster, A. Maly, T. Ruzicka, A. Ingber, and C.D. Enk. (2012) Noninvasive visualization of intraepidermal and subepidermal blisters in vesiculobullous skin disorders by in vivo reflectance confocal microscopy. *Lasers Med Sci*. **27**(1): p. 261-6.
112. Evans, C.L. and X.S. Xie. (2008) Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. **1**: p. 883-909.
113. Hanson, K.M. and C.J. Bardeen. (2009) Application of nonlinear optical microscopy for imaging skin. *Photochem Photobiol*. **85**(1): p. 33-44.

114. Mayer, E.J., J. Mobius, A. Euteneuer, W.W. Ruhle, and R. Szip Cs. (1997) Ultrabroadband chirped mirrors for femtosecond lasers. *Opt Lett.* **22**(8): p. 528-30.
115. Fekete, J., A. Cserteg, and R. Szipócs. (2009) All-fiber, all-normal dispersion ytterbium ring oscillator. *Laser Physics Letters.* **6**(1): p. 49.
116. Cserteg, A., V. Sági, A. Drozdy, Z. Varallyay, and G. Gajdáty. (2015) Characterization of mode-locking in an all-fiber, all normal dispersion ytterbium based fiber oscillator.
117. Pegoraro, A.F., A. Ridsdale, D.J. Moffatt, J.P. Pezacki, B.K. Thomas, L. Fu, L. Dong, M.E. Fermann, and A. Stolow. (2009) All-fiber CARS microscopy of live cells. *Opt Express.* **17**(23): p. 20700-6.
118. Saar, B.G., R.S. Johnston, C.W. Freudiger, X.S. Xie, and E.J. Seibel. (2011) Coherent Raman scanning fiber endoscopy. *Opt Lett.* **36**(13): p. 2396-8.
119. Wang, S., X. Chen, W. Wu, Z. Chen, H. Du, X. Wang, Y.V. Fu, L. Hu, and J. Chen. (2017) Rapid, label-free identification of cerebellar structures using multiphoton microscopy. *J Biophotonics.*
120. Wu, Z., T. Rademakers, F. Kiessling, M. Vogt, E. Westein, C. Weber, R.T.A. Megens, and M. van Zandvoort. (2017) Multi-photon microscopy in cardiovascular research. *Methods.*
121. Konig, K. (2008) Clinical multiphoton tomography. *J Biophotonics.* **1**(1): p. 13-23.
122. Weinigel, M., H.G. Breunig, A. Uchugonova, and K. Konig. (2015) Multipurpose nonlinear optical imaging system for in vivo and ex vivo multimodal histology. *J Med Imaging (Bellingham).* **2**(1): p. 016003.
123. Weinigel, M., H.G. Breunig, M.E. Darvin, M. Klemp, J. Rowert-Huber, J. Lademann, and K. Konig. (2015) Impact of refractive index mismatches on coherent anti-Stokes Raman scattering and multiphoton autofluorescence tomography of human skin in vivo. *Phys Med Biol.* **60**(17): p. 6881-99.
124. Sugata, K., O. Osanai, T. Sano, M. Akiyama, N. Fujimoto, S. Tajima, and Y. Takema. (2015) Evaluation of unique elastic aggregates (elastic globes) in normal facial skin by multiphoton laser scanning tomography. *Eur J Dermatol.* **25**(2): p. 138-44.

125. Springer, S., M. Zieger, K. Koenig, M. Kaatz, J. Lademann, and M.E. Darwin. (2016) Optimization of the measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo. *Skin Res Technol.* **22**(3): p. 356-62.
126. Koehler, M.J., K. Kellner, U.C. Hipler, and M. Kaatz. (2015) Acute UVB-induced epidermal changes assessed by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol.* **21**(2): p. 137-43.
127. Koehler, M.J., K. Kellner, M. Kaatz, and U.C. Hipler. (2016) Epidermal changes during UVB phototherapy assessed by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol.* **22**(4): p. 437-442.
128. Leite-Silva, V.R., W.Y. Sanchez, H. Studier, D.C. Liu, Y.H. Mohammed, A.M. Holmes, E.M. Ryan, I.N. Haridass, N.C. Chandrasekaran, W. Becker, J.E. Grice, H.A. Benson, and M.S. Roberts. (2016) Human skin penetration and local effects of topical nano zinc oxide after occlusion and barrier impairment. *Eur J Pharm Biopharm.* **104**: p. 140-7.
129. Yew, E., C. Rowlands, and P.T. So. (2014) Application of Multiphoton Microscopy in Dermatological Studies: a Mini-Review. *J Innov Opt Health Sci.* **7**(5): p. 1330010.
130. Zieger, M., S. Springer, M.J. Koehler, and M. Kaatz. (2015) [Multiphoton tomography]. *Hautarzt.* **66**(7): p. 511-21.
131. Seidenari, S., F. Arginelli, S. Bassoli, J. Cautela, A.M. Cesinaro, M. Guanti, D. Guardoli, C. Magnoni, M. Manfredini, G. Ponti, and K. Konig. (2013) Diagnosis of BCC by multiphoton laser tomography. *Skin Res Technol.* **19**(1): p. e297-304.
132. Klemp, M., M.C. Meinke, M. Weinigel, H.J. Rowert-Huber, K. Konig, M. Ulrich, J. Lademann, and M.E. Darwin. (2016) Comparison of morphologic criteria for actinic keratosis and squamous cell carcinoma using in vivo multiphoton tomography. *Exp Dermatol.* **25**(3): p. 218-22.
133. Dimitrow, E., M. Ziemer, M.J. Koehler, J. Norgauer, K. Konig, P. Elsner, and M. Kaatz. (2009) Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* **129**(7): p. 1752-8.
134. Oler, A.T. and A.D. Attie. (2008) A rapid, microplate SNP genotype assay for the leptinob allele. *J Lipid Res.* **49**(5): p. 1126-9.

135. Champy, M.F., M. Selloum, V. Zeitler, C. Caradec, B. Jung, S. Rousseau, L. Pouilly, T. Sorg, and J. Auwerx. (2008) Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse. *Mamm Genome*. **19**(5): p. 318-31.
136. Harrison, D.E., J.R. Archer, and C.M. Astle. (1984) Effects of food restriction on aging: separation of food intake and adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**(6): p. 1835-8.
137. Tang, L.L., X.H. Tang, X. Li, H.B. Yu, Z.G. Xie, X.Y. Liu, and Z.G. Zhou. (2014) Effect of high-fat or high-glucose diet on obesity and visceral adipose tissue in mice. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. **36**(6): p. 614-9.
138. Fontaine, D.A. and D.B. Davis. (2016) Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*. **65**(1): p. 25-33.
139. Surwit, R.S., C.M. Kuhn, C. Cochrane, J.A. McCubbin, and M.N. Feinglos. (1988) Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. **37**(9): p. 1163-7.
140. Levi, B. and M.J. Werman. (1998) Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J Nutr*. **128**(9): p. 1442-9.
141. Oimomi, M., M. Sakai, T. Ohara, N. Igaki, T. Nakamichi, S. Nishimoto, F. Hata, and S. Baba. (1989) The effect of fructose on collagen glycation. *Kobe J Med Sci*. **35**(4): p. 195-200.
142. Amaro-Ortiz, A., J.C. Vanover, T.L. Scott, and J.A. D'Orazio. (2013) Pharmacologic induction of epidermal melanin and protection against sunburn in a humanized mouse model. *J Vis Exp*. (79).
143. Distler, J.H., A. Jungel, L.C. Huber, U. Schulze-Horsel, J. Zwerina, R.E. Gay, B.A. Michel, T. Hauser, G. Schett, S. Gay, and O. Distler. (2007) Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum*. **56**(1): p. 311-22.
144. Brianezi, G., F. Grandi, E. Bagatin, M.M. Enokihara, and H.A. Miot. (2015) Dermal type I collagen assessment by digital image analysis. *An Bras Dermatol*. **90**(5): p. 723-7.

145. Huang, S., A.A. Heikal, and W.W. Webb. (2002) Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J.* **82**(5): p. 2811-25.
146. Cheng, J.X. (2007) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Appl Spectrosc.* **61**(9): p. 197-208.
147. Konig, K. and I. Riemann. (2003) High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt.* **8**(3): p. 432-9.
148. Zhuo, S., J. Chen, X. Jiang, T. Luo, R. Chen, S. Xie, and Q. Zou. (2007) Sequential multitrack nonlinear ex vivo imaging of esophageal stroma based on backscattered second-harmonic generation and two-photon autofluorescence. *Scanning.* **29**(5): p. 219-24.
149. PG Antal, R.S. (2012) Tuneable, low-repetition-rate, cost-efficient femtosecond Ti:sapphire laser for nonlinear microscopy. *Appl. Phys. (B 107)*: p. 17-22.
150. Liao, Y.H., S.Y. Chen, S.Y. Chou, P.H. Wang, M.R. Tsai, and C.K. Sun. (2013) Determination of chronological aging parameters in epidermal keratinocytes by in vivo harmonic generation microscopy. *Biomed Opt Express.* **4**(1): p. 77-88.
151. Ahmed, N. (2005) Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* **67**(1): p. 3-21.
152. Urasaki, Y., M.G. Johlfs, R.R. Fiscus, and T.T. Le. (2012) Imaging immune and metabolic cells of visceral adipose tissues with multimodal nonlinear optical microscopy. *PLoS One.* **7**(6): p. e38418.
153. Cheng, J.X. and X.S. Xie. (2004) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: Instrumentation, theory, and applications. *Journal of Physical Chemistry B.* **108**(3): p. 827-840.
154. You, T., N.C. Arsenis, B.L. Disanzo, and M.J. Lamonte. (2013) Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity : current evidence and potential mechanisms. *Sports Med.* **43**(4): p. 243-56.
155. Schjerve, I.E., G.A. Tyldum, A.E. Tjonna, T. Stolen, J.P. Loennechen, H.E. Hansen, P.M. Haram, G. Heinrich, A. Bye, S.M. Najjar, G.L. Smith, S.A. Slordahl, O.J. Kemi, and U. Wisloff. (2008) Both aerobic endurance and strength

- training programmes improve cardiovascular health in obese adults. *Clin Sci (Lond)*. **115**(9): p. 283-93.
156. Keylock, K.T., V.J. Vieira, M.A. Wallig, L.A. DiPietro, M. Schrementi, and J.A. Woods. (2008) Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **294**(1): p. R179-84.
157. Pence, B.D., L.A. DiPietro, and J.A. Woods. (2012) Exercise speeds cutaneous wound healing in high-fat diet-induced obese mice. *Med Sci Sports Exerc*. **44**(10): p. 1846-54.
158. Crane, J.D., L.G. MacNeil, J.S. Lally, R.J. Ford, A.L. Bujak, I.K. Brar, B.E. Kemp, S. Raha, G.R. Steinberg, and M.A. Tarnopolsky. (2015) Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging. *Aging Cell*. **14**(4): p. 625-34.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó eredeti közlemények:

Lorincz K, Haluszka D, Kiss N, Gyongyosi N, Banvolgyi A, Szipocs R, Wikonkal NM
Voluntary exercise improves murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity.

ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH 309: Paper 209. 7 p. (2017)

IF: 2,327

Haluszka D, Lőrincz K, Kiss N, Szipőcs R, Kuroli E, Gyöngyösi N, Wikonkál NM
Diet-induced obesity skin changes monitored by in vivo SHG and ex vivo CARS microscopy

BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 7:(11) pp. 4480-4489. (2016)

IF: 3,337

Dóra Haluszka, Kende Lőrincz, Gábor Molnár, Gábor Tamás, Attila Kolonics, Róbert Szipőcs, Sarolta Kárpáti, Wikonkál NM

In vivo second-harmonic generation and ex vivo coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy to study the effect of obesity to fibroblast cell function using an Yb-fiber laser based CARS extension unit

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 78:(9) pp. 823-830. (2015)

IF: 1,130

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Lőrincz K, Kiss N, Gyöngyösi N, Wikonkál NM

Hidradenitis suppurativa, az újra felfedezett betegség

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 92:(5) pp. 209-213. (2016)

Nóra Gyöngyösi, Kende Lőrincz, András Keszeg, Dóra Haluszka, András Bánvölgyi, Erika Tátrai, Sarolta Kárpáti, Wikonkál NM

Photosensitivity of murine skin greatly depends on the genetic background: Clinically Relevant Dose as a new measure to replace Minimal Erythema Dose in mouse studies
EXPERIMENTAL DERMATOLOGY 25:(7) pp. 519-525. (2016)

IF: 2,679

Gyöngyösi Nóra, Lőrincz Kende, Mihály Emese, Herszényi László, Tulassay Zsolt, Wikonkál Norbert

A gyulladássos bélbetegségek immunszuppresszív és anti-TNF-alfa-kezelésének bőrgyógyászati mellékhatásai

MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 68:(1) pp. 34-45. (2015)

Haluszka D, Lőrincz K, Csákányi A, Vass L, Krolopp Á, Kolonics A, Szipőcs R, Kárpáti S, Wikonkál N

Nemlineáris mikroszkópia alapjai és alkalmazási lehetőségei a dermatológiában
BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 91:(1) pp. 34-39. (2015)

Lőrincz K, Bánvölgyi A, Haluszka D, Keszeg A, Márton D, Kuroli E, Szipőcs R, K Scharfetter-Kochanek, M Wlaschek, Kárpáti S, Wikonkál N

Hosszú távú PUVA kezelés bőrregítő hatásának vizsgálata egereken

BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE 91:(1) pp. 18-22. (2015)

Gyongyosi N, Lorincz K, Karpáti S, Wikonkál N

Infliximabterápia mellett jelentkező lupus erythematosus [Development of lupus erythematosus during infliximab therapy]

ORVOSI HETILAP 154:(15) pp. 590-598. (2013)

11. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőmnek és mentoromnak, Wikonkál Norbert Professzor Úrnak, amiért bizalmat szavazott nekem és meghívott a kutatócsoportjába. Emellett köszönöm tanácsait és segítségét, melyekkel munkámat és szakmai fejlődésemet segítette a laborban és az osztályon egyaránt.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szipócs Róbertnek, hogy lehetőséget biztosított számomra a projekthez való csatlakozáshoz, továbbá köszönöm értékes szakmai tanácsait és segítségét, melyek nélkül a közlemények nem készülhettek volna el.

Szeretnék köszönetet mondani Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak, hogy lehetőséget biztosított számomra a kutatásaim elvégzéséhez, továbbá amiért támogatta a szakképzésbe történő felvételemet.

Köszönöm a kutatócsoport tagjainak Dr. Haluszka Dórának, Dr. Kiss Norbertnek, Dr. Bánvölgyi Andrásnak, Dr. Gyöngyösi Nórának, Dr. Márton Dalmának és Professzor Úrnak szakmai segítségük mellett a laborban és laboron kívül eltöltött vidám perceket. Külön kiemelném Dr. Haluszka Dórát, aki négy évig volt „padtársam”, és akire ezalatt és ezek után is mindig számíthattam, továbbá Dr. Kiss Norbertet, aki új lendületet adott a kutatómunkának.

Köszönöm Dr. Keszeg Andrásnak, volt TDK hallgatónknak, hogy bevezetett a sport világába.

Szeretném megköszönni továbbá Dr. Hársing Juditnak és Dr. Kuroli Enikőnek a szövegtani vizsgálatokban, illetve Seres Istvánnának és Pujcseva Ivettnek, a szövegtani mintafeldolgozásban nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Szüleimnek, Feleségemnek és Fiamnak támogatásukat és végtelen türelmüket!

Támogatás: Miniszterelnökség- TECH-09-A2-2009-0134 számú pályázat.