

**Az androgén túlsúly és a D-vitaminhiány anyagcsere  
változásokra és koszorúsér funkcióra kifejtett hatásai  
nőstény patkányokban**

Doktori értekezés tézisei

**Dr. Hadjadj Leila**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Várbíró Szabolcs, Med. habil., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Zsolt, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Gósi Gergely, Ph.D., konzultáns főorvos

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Pénzes István, az MTA doktora, Prof. Emeritus  
Tagok: Dr. László Ádám, Med. habil., egyetemi magántanár  
Dr. Studinger Péter, Ph.D., egyetemi adjunktus,

Budapest  
2020

## **Bevezetés**

A policisztás ovárium szindróma (PCOS) az egyik leggyakoribb endokrin megbetegedés, mely világszerte a nők 8-12%-át érint. A PCOS diagnózisa összetett, melyhez a fokozott androgén aktivitás, oligo-anovuláció és/vagy a policisztás petefészkek jelenlétén túl szükséges az egyéb, fokozott androgén termelést kiváltó ok vagy megbetegedés kizárása is. A PCOS szövődményei között gyakoriak a kardiometabolikus megbetegedések, az inzulin rezisztencia, az elhízás és a magas vérnyomás betegség. A betegek közel 75-80%-a szenved inzulin rezisztenciában, a mely a nők megfelelő kor- és testtömeg index arányos csoportjához viszonyítva igen magas.

A D-vitaminhiány a Föld lakosságának 30-50%-át érintő probléma. Irodalmi adatok alapján a PCOS-s betegek 67-85%-ában a keringő D-vitamin szintje nagyon alacsony (<20 ng/ml). Az inzulin rezisztencia, a D-vitaminhiány és az androgén túlsúly gyakori, közös előfordulását PCOS-ben már számos korábbi tanulmány leírta. Az androgén túlsúlyos PCOS nők egészséges kortársaikhoz képest dupla akkora relatív kockázattal bírnak a koszorúsér megbetegedések kialakulására nézve. A szérum D-vitamin szintek és a koszorúsér megbetegedések előfordulása között fennálló, ellentétes előjelű kapcsolatot a vonatkozó kutatások a közelmúltban igazolták.

A PCOS rágcsgáló modellek kiválóan alkalmasak a D-vitaminhiány és az androgén túlsúly érhataásainak tanulmányozására. A hiperandrogén nőstény patkányok aorta gyűrűin végzett korábbi kísérletek kimutatták, hogy a noradrenalin indukált kontrakció fokozódik, míg az endoteliális nitrogén monoxid indukált relaxáció csökken, valamint a kalcitriol alkalmazása javítja az erek relaxációs képességeit. A fenti kísérlet során az androgén túlsúlyban szenvedő nőstény patkányok erei sokkal rigidebb falúak voltak, így az érlumenben kialakuló vérnyomásváltozásokhoz történő alkalmazkodó képességük is jelentősen csökkent. Ez a csökkent adaptációs kapacitás az érfali remodeling első lépéseként értelmezhető, mely tartós fennállás esetén segíti a magasvérnyomás betegség kialakulását.

A rendelkezésre álló eredmények alapján feltételezhető, hogy az androgén túlsúlyos PCOS-ben kialakuló, az érfalat érintő negatív változásokat (eutróf remodeling) a D-vitaminpótlás képes lehet csökkenteni és esetlegesen megakadályozni.

## **Célkitűzések**

Kísérletünkkel egy új típusú, hiperandrogén és D-vitaminhiányos PCOS patkánymodellt szerettünk volna létre hozni, melyben megfigyelhetők a koszorúereken végbe menő korai biomechanikai és anyagcsere változások.

1. Ebben az új, krónikus patkánymodellben a PCOS-t transzdermális tesztoszteronkezeléssel kívántuk kialakítani. A modellünkben célunk volt az összes, jól ismert PCOS-ben jelentkező fenotípus és metabolikus változás reprodukálása is.
2. Céljaink között szerepelt a D-vitaminhiánynak és a hiperandrogén állapotnak a női szaporodó szervrendszerre, az anyagcserére és az inzulin rezisztenciára kifejtett általános hatásaink vizsgálata (pl. ovulációs arány, testtömeg változás, glükóz tolerancia stb.).
3. A vizsgálat során a koszorúserek azon korai biomechanikai változásait kívántuk feltérképezni, melyek felelőssé tehetőek fogamzó képes korú nőkben a fenti kórállapotokban jellemző kardiovaszkuláris megbetegedésekért. Feltételezzük, hogy PCOS-ben mind a D-vitaminhiány, mind az androgén túlsúly vaszkuláris inzulin rezisztenciát alakíthat ki, mely a koszorús erek csökkent dilatációs kapacitását, illetve az érfal remodelingjét eredményezheti.

## **Módszerek:**

**Gyógyszerek és egyéb kémiai anyagok.** A hiperandrogén állapotot transzdermális tesztoszteron (T) gél (Androgel 1% from Lab. Besins International S.A, Párizs, Franciaország) alkalmazásával értük el. A D-vitaminpótlást kolekalciferol oldattal végeztük (Vigantol oil 20.000 IU/ml from Merck/Merck Serono12, Mumbai, Maharashtra, India). Az *in vitro* kísérletekhez Krebs-Ringer oldatot használtunk. A maximális passzív simaizom relaxáció mérése kalcium mentes Krebs oldattal történt. A maximális vazokonstriktió méréséhez az U46619-t (potens tromboxán A<sub>2</sub> receptor agonista a TOCRIS Bio-Techne cégtől, Bristol, Egyesült Királyság) használtuk, míg potens érrelaxánsként adenzint alkalmaztunk (Adenocor, Sanofi-Aventis, Madrid, Spanyolország). Az inzulin érhatait humán-rekombináns inzulinnal vizsgáltuk (Actrapid pentafill 100 IU/ml from Novo Nordisk, Koppenhága, Dánia).

Az állatok altatására 45 mg/kg intraperitonealis Nembutalt adtunk be (Phylaxia-Sanofi, Budapest, Magyarország).

**Állatok.** A kísérletbe 46, 4 hetes, 90-110 gramm súlyú nőtény Wistar patkány került bevonásra, melyeket a Semmelweis Egyetem Állatháza biztosított. Az állatok számára ad libitum víz és a protokollnak megfelelő D-vitaminmentes vagy normál táp állt rendelkezésre. A kísérlet alatt az állatoknál semmilyen komplikációt nem észleltünk. A vizsgálat mindenben

megfelelt a vonatkozó hazai és nemzetközi előírásoknak, és az egyetemi etikai bizottság engedélyével rendelkezett (Eng.szám: PEI/001/820-2/2015).

**Krónikus kezelés.** A 46 állatot 4 csoportra osztottunk. Az állatok testtömegét a protokoll alatt rendszeresen mértük, a kísérlet végeztével pedig testtömeg gyarapodási arányt számoltunk (body mass gain ratio) az alábbi módon (%): a végső testtömeg/ a kezdeti testtömeg \*100%. Huszonnégy D-vitamin pótoló étrendben részesült (Ssniff Germany –SM Rat/mouse complete chow; D<sub>3</sub> vitamint tartalma 1000 IU/kg), melyek közül 12 további transzdermális T kezelést kapott heti 5 alkalommal. Az állatokat a 2. héttől testtömeg adaptált, szájon át történő D-vitaminpótlásban részesítettük, hogy biztosítsuk számukra az optimális szérumszintet 25-hydroxikolecalciferol szintet (30ng/ml). A kezelés során az állatok egyszeri 500 IU Vigantol olajat kaptak a 2. héten, majd a 4. héttől hetente 3000 NE/kg testtömeg adaptált kezelésben részesültek.

Huszonkét állatot a kezelés alatt teljesen D-vitaminmentesen tápláltunk (Ssniff Germany - EF Rat/mouse vitamin D free complete chow; D<sub>3</sub> vitamin tartalom < 5 IU/kg), melyből 11 szintén T kezelésben részesült. A T gél a második héttől heti ötször alkalmaztuk az alábbi dózisban: 0.033mg gél/ testtömeg gramm, mely közel tízszeres szérumszint emelkedést eredményezett. A patkányok hátáról a szőrt a kezelés előtt rendszeresen leborotváltuk.

**Orális glükóz terheléses vizsgálat (OGTT) és HOMA-IR.** A 6. héten OGTT vizsgálat, plazma inzulin és glükóz mérés történt. Az éheztetést követően az állatoknak szájon át fecskendővel 30% glükóz oldatot 2g/ testtömeg kg) adtuk be. A 0' - 60' - 120' perces vércukorértékeket regisztráltuk, míg 0'-120' perces értékekhez tartozó plazma inzulinszinteket ELISA segítségével mértük (Merck/Merck Millipore, Darmstadt, Németország/ Budapest, Magyarország). A HOMA-IR értékeket az éhomi plazma inzulin és vércukor szintek segítségével számítottuk: éhomi plazma inzulin (milliunit per liter) × éhomi plazma glükóz (millimól per liter)/22.5.

**Szexuális szteroid, D-vitamin és leptin értékek.** A kezelés 6. és 8. hetében vért vettünk az állatok farok vénájából. A vérszérumok 5-dihidrotesztoszteron, 5-hidroxycholecalciferol, progeszteron és T szintjét magas teljesítményű folyadék kromatográfia segítségével határoztuk meg. A leptin szinteket ELISA-val mértük a 8. héten (Phoenix Pharmaceuticals/ Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Németország).

**Hüvelyváladék és petefészkek morfológia.** A 6. kezelési héttől naponta hüvelyváladék vizsgálatot és ösztrusz cikluselemzést végeztünk. A kezelés végén a petefészkek tömegét megmértük. A petefészkeket formaldehid oldatban tartósítottuk, majd paraffinba ágyasztuk. A szövettani elemzés hematoxylin –eozin festést követően történt. Minden csoportból

reprezentatív mintát vettünk (n=6) és a policisztás petefészek szindróma morfológiai változásait kerestük. A tüszők és a sárgatestek számát, átmérőjét és a teljes petefészek területéből elfoglalt arányukat AxioVision Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd., Budapest, Magyarország) szoftverrel elemeztük.

A 8. héten *in vitro* nyomás angiomertiás méréseket végeztünk a bal koszorúsér elülső leszálló ágának vég- és oldalágainak 200 mikrométeres külső átmérőjű szegmenseivel. Az arteriolák belső és külső átmérőjét videomikroszkópos technikával mértük. Az eredmények segítségével spontán miogén tónust, maximális konstrikciót és passzív relaxációt, valamint inzulin indukált érreaktivitást számítottunk, statisztikai elemzést készítettünk. Az erek inzulin és D-vitamin receptor sűrűsége immunhisztokémiai vizsgálattal került meghatározásra.

**Transztorakális szívultrahang vizsgálat és invazív artériás vérnyomásmérés.** Mindkét vizsgálat a kezelés végén (8. hét) történt pentobarbitál altatás segítségével. A balkamráról alkotott képek a hosszanti tengely mentén, B-módban készültek. A végdiasztolés és végszisztolés szívtérfogatot a fenti módon mért bal kamrai terület (left ventricular area - LVA) és hossz (left ventricular length – LVL) segítségével az alábbi módon számítottuk:  $8(LVA_d)^2/3\pi LVL_d$  and  $8(LVA_s)^2/3\pi LVL_s$  (a képletben a *d* és *s* index a diasztolét és szisztolét jelöli). Az invazív artériás vérnyomás mérése az arteria carotis interna kanülálásával aszeptikus körülmények között történt.

**Mikroangiometria.** A kezelés 8. hetében az állatokat elaltattuk, szívüket eltávolítottuk, 2 percig heparinos normál Krebs Ringer oldattal perfundáltuk, majd a szívtömeget megmértük. Mikropreparációra a bal elülső, leszálló koszorúsér *in vivo* 100-150 mikrométeres intramurális arteriolái közül választottunk. Az arteriolát kiperaráltuk, és egy Krebs-Ringer oldatot tartalmazó speciális kádba helyeztük. Az érnek mindkét végét kanüláltuk és az eret élettani hosszúságára nyújtottuk. Minkét mikrokanült egy nyomáscservó pumpához (Living Systems, Burlington, VT, USA) csatlakoztattuk, majd az eret áramlásmentes környezetben 50 Hgmm intraluminális nyomás mellett inkubáltuk. Az arteriola külső és belső átmérőjét videomikroszkóppal ellátott mikroangiometriás vizsgálórendszerrel rögzítettük. Ennek során az eret tartalmazó üvegfenekű kádat egy inverz Leica mikroszkóphoz rögzítettük. A nagyított képet egy Leica videokamera (DFC 320) továbbította a számítógépes állomásra, ahol egy erre a célra kifejlesztett QWin Leica szoftver alkalmazásával mértünk és dolgoztuk fel a felvételeket. Az arteriolát fix intraluminális nyomáson (50 Hgmm) és hőmérsékleten (37 Celsius fok) oxigenizált Krebs oldatban harminc percig inkubáltuk, majd ezt követően az intraluminális nyomást 0 Hgmm-re csökkentettük és 10 Hgmm-enként leolvastva az átmérőket, 150 Hgmm-ig emeltük. Ezt háromszor ismételtük meg, majd a harmadik görbe értékeit rögzítettük és elemeztük, mely legjobban jellemezte az

ér passzív mechanikai tulajdonságait az adott közegben. A nyomás-átmérő jelleg görbéket az erek tornáztatása után (0-150-0-150 Hgmm) az intraluminális nyomás fokozatos emelése mellett (lépésenként 10 Hgmm, 0 Hgmm-től a 150 Hgmm nyomás eléréséig) vettük fel. Minden egyes lépcsőnél az egyensúlyi állapot beálltát követően történt a felvétel és a mérés. Ezt követően az eret 50 Hgmm-es nyomáson 10 percig pihenni hagytuk és nyugalmi átmérőjét a kalibrációs idő leteltével ismét lemértük. A következő lépésben a szervfürdőhöz emelkedő dózisban inzulint adtunk (30-100-300-600 mIU/ml; 1IU= 0.035mg inzulin) és az egyes dózisok mellett az eret 8 percig inkubáltuk. A kialakult egyensúlyi állapotban az egyes dózisokra adott érválaszt rögzítettünk és az eredményekből dózis-hatás görbét készítettünk. Kimosást követően egyszeri, nagy dózisú ( $10^{-6}$ M) tromboxán  $A_2$  receptor agonistát (U46619) adtunk a szervfürdőhöz, majd 5 perc inkubáció után a fenti módszerhez hasonló a nyomáslépcsők segítségével nyomás-átmérő jelleg görbéket felvettük. A továbbiakban 50 Hgmm-en kimosás nélkül emelkedő dózisban ( $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M) koszorúereket tágító adenzint a adtunk szervfürdőhöz. Az egyes dózisokon az eret 3 percig inkubáltuk, majd a külső és belső átmérőket rögzítettük. Végezetül kalciummentes oldatban húsz perces inkubációt követően a teljesen relaxált érátmérőket mértük a korábban már ismertetett nyomáslépcső (nulláról 150 Hgmm-re) segítségével. A mérések kalibrálására Wild-féle mikrométer etalont használtunk.

**Biomechanikai számítások.** Az ér teljes kontrakcióját ( $T_{teljes}$ ) az alábbi módon számoltuk:  $T_{teljes} = 100 * (R_{kalcium\ mentes} - R_{U46619}) / R_{kalcium\ mentes}$  (%), ahol  $R_{kalcium\ mentes}$  kalcium mentes oldatban, míg  $R_{U46619}$  a tromboxán  $A_2$  agonista mellett mért érsugár. A spontán (miogén) tónust ( $T_{nKR}$ ) így számoltuk:  $T_{nKR} = 100 * (R_{kalcium\ mentes} - R_{nKR}) / R_{kalcium\ mentes}$  (%), ahol  $R_{nKR}$  az ér sugara normal Krebs oldatban. Az adenzine indukált relaxációt az emelkedő dózisú adenzin hatása mellett mért érsugarak ( $R_{Ade}$ ) segítségével számoltuk:  $T_{Ade} = 100 * (R_{Ade} - R_{U46619}) / R_{kalcium\ mentes}$  (%). A tangenciális stresszt ( $Tg_{stressz}$ ) a Laplace törvény szerint kalkuláltuk ki:  $Tg_{stressz} = P * R_i / h_{nKR}$ , ahol P az éren belüli nyomást,  $R_i$  a belső sugarat és  $h_{nKR}$  a normál Krebs oldatban mért falvastagságot jelöli. A falvastagságot a külső ( $R_k$ ) és a belső sugár ( $R_b$ ) különbsége ként adtuk meg:  $h = R_k - R_b$ , A circumferenciális inkrementális elasztikus modulust így számoltuk:  $E_{inc} = (dP/dR_k) * 2(R_b * R_k^2) / (R_k^2 - R_b^2)$ , ahol  $E_{inc}$  az inkrementális elasztikus modulus, míg  $dR_k$  a külső sugarak intraluminális nyomásváltozásra ( $dP$ ) méretkülönbségeit jelöli. Az érfal keresztmetszetében mért érfal gyűrűalakú területét ( $A$  -érfelszín) a külső és belső érsugár változásaiból számoltuk kalcium mentes oldatban:  $A = (R_{k\ kalcium\ mentes}^2 - R_{b\ kalcium\ mentes}^2) * \pi$ . Az inzulin hatás mellett kialakult maradék értónust ( $T_{Inz}$ ) az alábbi módon adtuk meg:  $T_{Inz} = 100 * (R_{kalcium\ mentes} - R_{Inz}) / R_{kalcium\ mentes}$  (%), ahol  $R_{Inz}$  az inzulin hatás mellett mért sugár.

**Az erek elasztikus rosttartalma.** A mikroangiometrás vizsgálaton átesett szegmenssel szomszédos arteriolát formaldehidben fixáltuk és hematoxylin – eozinnal, valamint rezorcin -fukszinnal megfestettük. Az erek miroszkópos képét és morfológiai változásait a már említett Axio Panoramic Viewer szoftterrel mértük (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). A rezorcin-fukszin festett metszetek képében a magenta (“rózsaszín”) szín elnyomja a zöldet az RGB képeken, mely a zöldszín intenzitásának csökkenésével jár. Ezt az intenzitás csökkenést (0-255) az ér endotheljének belső felszíne felől sugárirányban mértük.

**Az erek inzulin és D-vitamin receptor (VDR) sűrűsége.** A paraffinba ágyazott érmetszeteket béta-inzulin receptor és VDR ellenes antitestekkel festettük meg (BenchMark ULTRA Automated IHC/ISH slide staining system, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). A vizsgálathoz monoklonális egér anti inzulin receptor beta (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) és poliklonális nyúl anti VDR (Abcam, Cambridge, UK) antitesteket használtunk. A különböző jelöléseket diaminobenzidinnel (DAB) és hematoxilín-eozin ellenfestéssel tettük láthatóvá, melyhez az UltraView Universal DAB Detection Kitet használtuk (Ventana Medical Systems, Inc., Oro Valley, Arizona, USA). Az erekről a mikroszkópos felvételeket Zeiss Axio Imager rendszerrel (Zeiss, Oberkochen, Németország) készítettük. A pozitív festődésű területeket (külön az endothelre és a tunica médiára) az ér összterületének százalékaként adtuk meg és az ImageJ szoftverrel mértük (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

**Statisztikai analízis** A statisztikai analízis a GraphPad Prism 6.0 programmal (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA) történt. A statisztikai elemzés során a kétutas repeated-measures ANOVA módszert használtunk ott, ahol a 4 csoportban két független változót tesztelünk és a független változóban két vagy több paraméter volt jelen (pl. intraluminális nyomás függvényében hasonlítottuk össze az egyes csoportok görbéit). A diszkrét paraméterek kiértékelésére egyutas ANOVA-t (pl.: testtömeg) a cukorterhelés során mért glükóz és inzulin értékek összehasonlítására kétutas ANOVA-t használtunk. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM (standard error of the mean - átlag szórás) értékekkel adtuk meg.

## **Eredmények:**

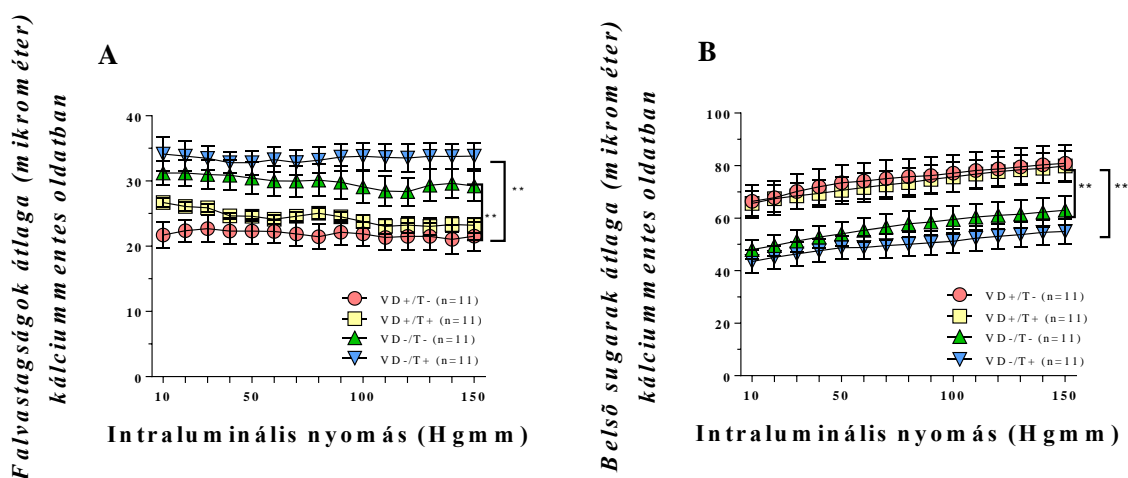
**Fenotípus változások és szérum hormon szintek.** A kezelés végén (8.hét) a transzdermális T kezelést kapott állatok testtömege szignifikánsan magasabb volt (VD+/T+ 327,8  $\pm$  8,3 g; VD-/T+ 327,8  $\pm$  8,3 g;  $p < 0,01$ ), mint a nem kezeltéké (VD+/T- 282,5  $\pm$  6,2 g; VD-/T- 296,9  $\pm$  3,9 g).

A D-vitaminhiányos táplálás ötször alacsonyabb 25-hydroxikolecalciferol szérumszinteket eredményezett ( $p < 0,01$ ), míg a D-vitamin kiegészítés effektíve megakadályozta a D-vitaminhiány kialakulását a megfelelő csoportokban. A transzdermális T kezelést kapott állatok szérumszintje (VD+/T-  $0,311 \pm 0,16$ , VD-/T-  $0,72 \pm 0,16$ , VD+/T+  $4,29 \pm 0,56$  és VD-/T+  $5,46 \pm 0,56$  ng/ml;  $p < 0,01$ ) és 5-DHT szintje (VD+/T-  $0,10 \pm 0,01$ , VD-/T-  $0,12 \pm 0,02$ , VD+/T+  $0,62 \pm 0,14$  és VD-/T+  $0,60 \pm 0,16$  ng/ml;  $p < 0,05$ ) szignifikánsan magasabb volt, mint a nem kezelték. A D-vitaminos, T kezelt állatok leptin szintjei szignifikánsan nőttek a „dupla kontroll” (VD+/T-) állatokhoz képest ( $p < 0,05$ ).

A PCOS-ben jellemző petefészek morfológia (sok, kicsi primordiális tüsző, kevés vagy hiányzó sárgatest) nem csak T kezelt állatokban, hanem D-vitaminhiányban is kialakult. Csak a „dupla kontroll” csoportban volt jelen a petefészkekben domináns tüsző, valamint sárgatest. Ezen állatok intakt ösztrusz ciklusainak száma az utolsó 14 vizsgálati napon  $3,64 \pm 0,15$  volt. Ehhez képest már a VD-/T- csoportban szignifikánsan alacsonyabb ciklusszámmal találkoztunk ( $2,00 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ), míg a T kezelt csoportokban az intakt ciklusok száma drámai csökkenést mutatott (VD+/T+  $0,9 \pm 0,21$ , VD-/T+  $0,36 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$  mindkét csoportra vs. VD+/T+).

**Transztorakális szívultrahang vizsgálat és invazív artériás vérnyomásmérés.** A csoportok között nem találtunk szignifikáns eltéréseket sem a vérnyomás, sem a szívultrahang paraméterek (bal kamrai szisztolés és diasztolés térfogat, ejekciós frakció vagy egyéb a bal kamra hipertrófiá alakulására jellemző érték) tekintetében.

**A koronária arteriola geometriája és sima izom tónusa.** Mindkét D-vitaminhiányos csoportra jellemző volt a szignifikánsan alacsonyabb belső sugár, a szűkebb passzív érlumen és a vastagabb fal. ( $p < 0,01$  vs. mindkét VD+ csoport, 1/A ábra).



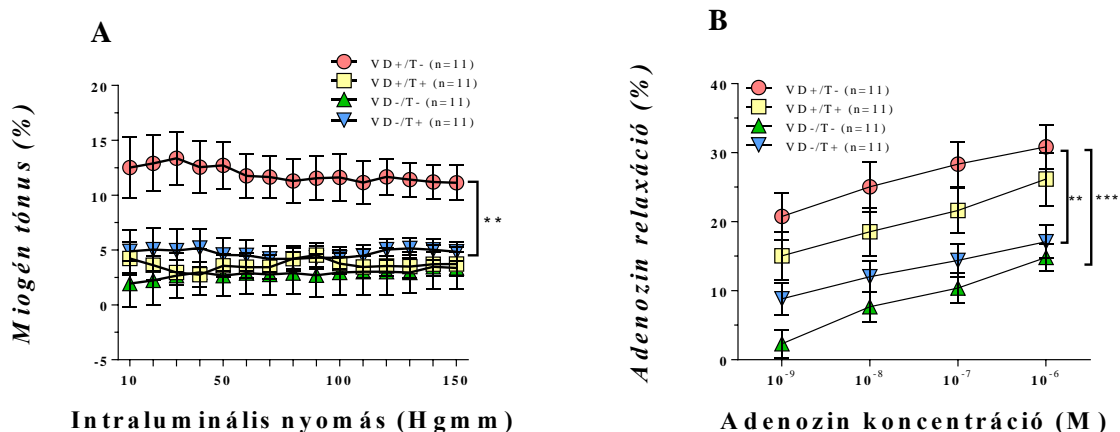
**1. Ábra.** A koszorúsér arteriolák geometriai jellemzői D-vitamin pótlott, D-vitaminhiányos, tesztoszteron kezelés és nem kezelt nőtény patkányokban. A. Falvastagságok a teljesen relaxált arteriolákban (kalciummentes oldatban). A D-vitaminhiányos erek falvastagsága



szignifikánsan magasabb, mint a pótoltaké ( $p < 0,01$ ). **B.** Belső sugarak teljesen relaxált arteriolákban (kálciummentes oldatban). Mindkét D-vitaminhiányos csoport sugarai szignifikánsan alacsonyabbak, mint a D-vitamin pótolta ereké. ( $p < 0,01$ ). A D-vitaminhiányos erek keskenyebbek, szűkebbek és vastagabb falúak voltak. Feltüntetett értékek: átlagok  $\pm$ SEM (standard error of the mean – átlag szórás)

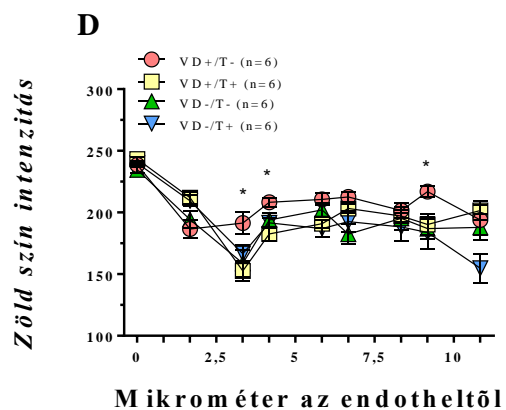
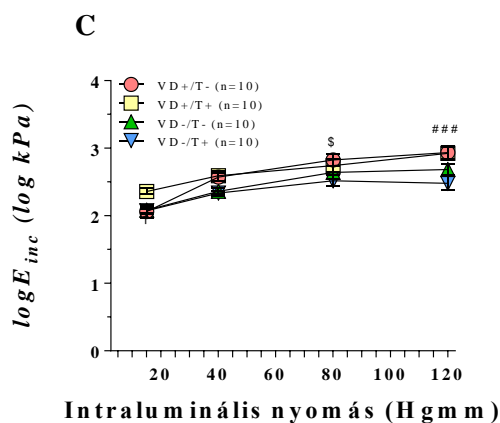
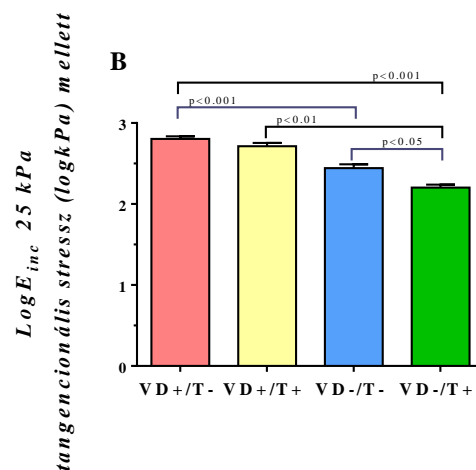
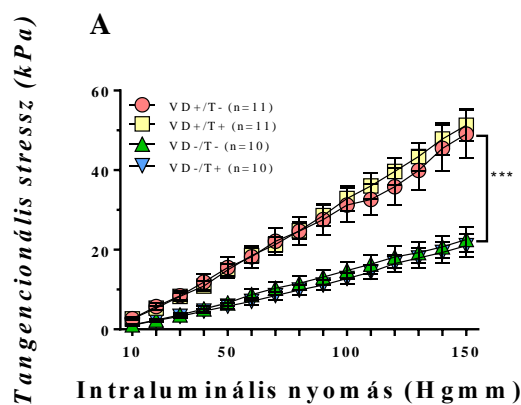
A D-vitaminhiányos állapot a koszorúsér arteriola fal “tömegének” változását eredményezte (falfelszín eredmények). A legmagasabb értékekkel a VD+/T- csoport rendelkezett ( $20,1 \pm 3,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,01$  mindhárom másik csoport). D-vitaminhiányban ezek az eredmények jócskán alacsonyabbak volt (a VD-/T- csoportban  $11,4 \pm 1,05 \mu\text{m}^2$ , a VD-/T- csoportban  $10,9 \pm 0,91 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ ). A T kezelés a D-vitaminpótlás ellenére a falfelszín csökkenését eredményezte (VD+/T+  $14,3 \pm 1,57 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ ).

A D-vitaminhiány és a T kezelés külön-külön és együtt is az erek spontán tónusának szignifikáns csökkenését okozta (2/A ábra,  $p < 0,01$  mindhárom csoport a VD+/T- csoporttal szemben). Maximális kontrakciót a tromboxán  $A_2$  agonistával (U46619,  $1 \mu\text{mol/liter}$  50 Hgmm-en) vizsgáltuk. A belső sugárból számolt kontrakció a “dupla kontroll” (VD+/T-) esetén  $54,6 \pm 3,2\%$  volt, melytől nem tért el szignifikánsan a VD+/T+ csoport eredménye ( $54,1 \pm 4,1\%$ ). Ezzel szemben mindkét D-vitaminhiányos csoportban jelentős kontrakciós kapacitás csökkenés volt észlelhető: VD-/T-  $26,7 \pm 4,7\%$  és VD-/T+  $34,8 \pm 1,9\%$  ( $p < 0,01$  mindenütt VD+ és VD- csoportok között). Ezt követően adenzin segítségével az erek simaizom relaxációját vizsgáltuk. A két D-vitaminhiányos csoport relaxációs kapacitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a “dupla kontroll” ereké ( $p < 0,01$ , 2/B ábra).



**2. Ábra. A koszorúsér arteriolák kontraktilis és relaxáció kapacitásának jellemzése. A.** Miogén tónus növekvő intraluminális nyomásokon normal Krebs oldatban. Egy vagy mindkét noxa a miogén tónus szignifikáns csökkenéséhez vezetett az egész nyomás tartományban (\*\*-  $p < 0,01$  VD+/T- vs mindhárom másik csoport). **B.** Adenzin relaxáció 50 Hgmm intraluminális nyomáson. A D-vitamin hiány egyedül (\*\*-  $p < 0,01$ ) és T kezeléssel (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) a relaxációs kapacitás szignifikáns csökkenését okozta a “dupla kontroll” csoporthoz képest. Feltüntetett értékek: átlagok  $\pm$ SEM

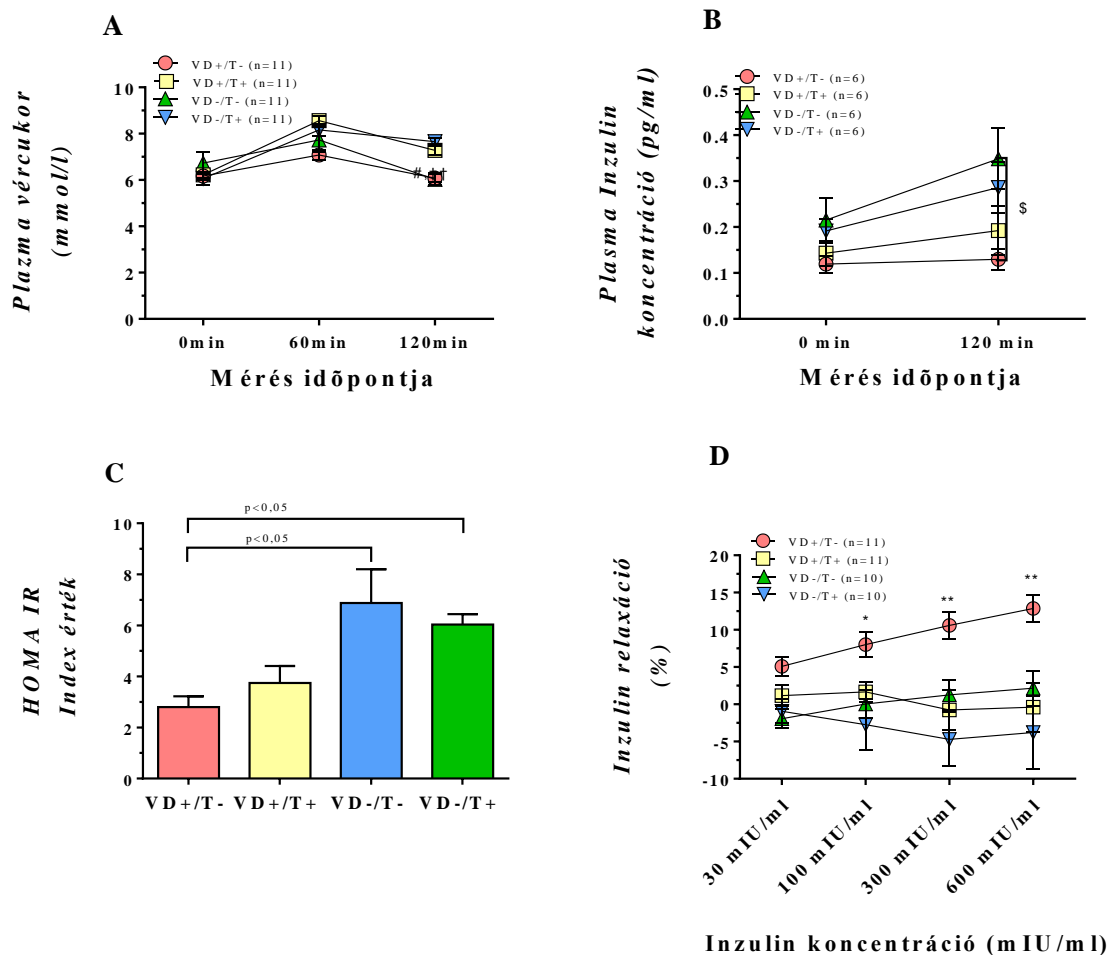
**A koronária arteriola elasztikus tulajdonságai.** Az erek falának tangencionális stressz értékei mindkét D-vitaminhiányos csoportban szignifikánsan alacsonyabbak volt, mint a D-vitaminpótlásban részültek csoportoké ( $p < 0.001$  50Hgmm feletti intraluminális nyomásokon; 3/A ábra). Az elasztikus modulust a tangencionális stressz függvényében is megvizsgáltuk a fal geometriától független elasztikus tulajdonságait elemzése céljából. A 25 kPa (magas stressz) mellett kapott értékek a D-vitaminhiányos csoportokban szignifikánsan kisebbek voltak a D-vitaminos csoportokhoz képest (VD-/T- és VD-/T+ vs. VD+/T-  $p < 0,001$ ; VD-/T- és VD-/T+ vs. VD+/T+  $p < 0,01$  és  $p < 0,05$ ; 3/B ábra). Ha az elasztikus modulus az intraluminális nyomás ellenében ábrázoltuk, a “dupla kontroll” csoport az egész nyomástartományban eltérést mutatott a D-vitaminhiányos csoportoktól ( $p < 0,05$ ), mely a nyomás emelésével a VD-/T+ csoporttal szemben még markánsabbá vált (3/C ábra). A “dupla kontroll” szövettani eredményei alapján ezen erek fala szignifikánsan kevesebb elasztikus komponenst tartalmazott, mint a másik három csoporté ( $p < 0,05$ ).



**3. Ábra A koronária arteriola elasztikus tulajdonságai.** **A.** Az erek falának tangencionális stressz értékei. Mindkét D-vitaminhiányos csoportban szignifikánsan alacsonyabbak, mint a D-vitaminpótlásban részültek csoportoké (\*\*\*)-  $p < 0,001$  50 Hgmm feletti intraluminális nyomásokon). **B.** Elasztikus modulus a tangencionális stressz függvényében (geometriától független elasztikus

tulajdonságok). A D-vitaminhiányos csoportok értékei szignifikánsan kisebbek voltak a D-vitaminos csoportokhoz képest (a szignifikancia az ábra felett jelölve). **C.** Inkrementális elasztikus modulus. A „dupla kontroll” csoport eltért a D-vitaminhiányos csoporttól ( $p < 0,05$ ), mely a nyomás emelésével a VD-/T+ csoporttal szemben markánsabbá vált (3/C ábra). **D.** Elasztikus rost sűrűség. Ha zöld szín alacsony intenzitású, akkor a rosttartalom magas. A „dupla kontroll” szignifikánsan kevesebb elasztikus komponenst tartalmazott, mint a másik három csoport (\*-  $p < 0,05$ ).

**Inzulin rezisztencia:** A cukorterheléses vizsgálat éhomi vércukor és inzulin értékeiben nem volt a 4 csoport között szignifikáns különbség. A VD-/T+ állatok 60 perces vércukorértékei szignifikánsan magasabbak lettek, mint a VD+/T- csoporté ( $p < 0,05$ , 4/A ábra). Ez az eltérés a 120 perces értékeknél is jelen volt, mely eltérés a VD+/T+ állatok értékeiben is jelentkezett (4/A ábra,  $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ). A VD-/T- állatok 120 perces plazma inzulin értékei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a VD+/T- csoporté (4/B ábra,  $p < 0,05$ ).



**4. Ábra:** OGTT alatt mért plazma glukóz (A) és inzulin (B) szintek, számított HOMA Index (C) és az erek inzulin relaxációja (D). Tesztoszteron kezelés mellett a „dupla kontroll” csoporthoz képest szignifikánsan magasabb vércukorértékek voltak mérhetőek ( $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ), míg a plazma inzulin koncentráció változatlan maradt OGTT alatt. Ezzel szemben a VD-/T- állatok plazma inzulin értékei szignifikánsan nőttek ( $p < 0,05$ ) normál cukorterheléses vércukor szintek mellett. Az inzulin relaxáció mind D-vitaminhiányban, mint T kezelés mellett károsodott volt ( $p < 0,01$ ).

A számított HOMA IR (inzulin rezisztencia) index mindkét D-vitaminhiányos csoportban inzulín rezisztenciát jelezett. (4/C ábra). Az erek inzulín relaxációja már egy károsító tényező jelenléte esetén is szignifikánsan romlott a kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ , mind a három csoportban vs VD+/T-, 4/D ábra).

**Az erek inzulín és D-vitamin receptor sűrűsége.** Mind az inzulín ( $p < 0,001$ , minden VD- vs VD+ csoport), mint a D-vitamin receptor sűrűség magasabb volt a D-vitaminhiányos csoportokban ( $p < 0,01$  és  $0,001$ , minden VD- vs VD+ csoport).

## **Megbeszélés:**

**Fenotípus változások.** A kezelési protokoll végeztével a T kezelt nőstények szérúm T és DHT szintje jelentősen megemelkedett. A T kezelésben nem részesült állatok nemi hormon szintjei normál szinten maradtak, mely szintén bizonyította a T kezelés hatásosságát. Az androgén túlsúlyos állatok a PCOS-ben észlelt fenotípus változásokat mutatták: testtömegük a kezelés végére jelentősen nagyobb volt a kezeletlen állatokéhoz képest, melyet a testtömeg növekedési index is jól mutatott. A D-vitamin szintek a kezeléstől elvártak szerint alakultak: a D-vitamin pótoltt állatok hormon szintje a magas normál, míg a D-vitaminmentesen tápláltaké a kórosan alacsony, a felnőtt PCOS nőkben leírt szérumszintekhez hasonló tartományban mozgott.

A transzdermális T kezelésben részesült nőstény patkányokban az ösztrosz ciklusok száma kifejezetten csökkent, melyet a domináns tüszők és a sárga test kialakulásának hiánya illetve alacsony aránya is jól mutatott. Megfigyeléseink azt mutatták, hogy a T kezelésben nem részesült, de D-vitaminhiányos állatok ösztrosz ciklusainak száma is csökkent, melyet a megfelelő tüsző és sárga test szám változása kísért. Mivel a D-vitamin fontos eleme Anti-Müllerian hormon szignál transzdukciós útjának, illetve befolyásolja petefészkek a follikulus stimuláló hormon érzékenységét, valamin hat a granulóza sejtek progeszteron produkciójára is, D-vitaminhiányban a PCOS-hez hasonló (PCOS-like) petefészkek morfológia és ovulációs zavarok alakulhatnak ki.

**Az arteriolák biomechanikai tulajdonságai.** Megfigyeléseink igazolták, hogy nem csak a T kezelés, hanem a D-vitaminhiány is képes volt önmagában az arteriolák geometriáját megváltoztatni. A D-vitaminhiány kisebb belső érsugarat és nagyobb falvastagságot eredményezett mindkét kezelt csoportban. Androgén túlsúlyban a koszorúér arteriolákon a hipotróf remodeling jelei mutatkoztak. A tromboxán A2 agonist indukált maximális kontrakciós és az adozin indukált relaxációs kapacitás csökkent volt mindkét D-vitaminhiányos csoportunkban (2/B ábra). A D-vitaminpótlás javította az adott T kezelt

csoport ezen paramétereit. A D-vitaminhiány az ér mindkét irányú (kontrakciós és relaxációs) kapacitástartományát csökkentette, míg a T kezelés inkább a relaxációt rontotta. Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy mindkét kórállapot károsítja a koszorúsér arteriolák adaptációs képességeit és negatívan befolyásolja a szöveti véráramlás szabályozásában játszott szerepüket. Ezen változások hosszú távú következménye lehet az értónus krónikus fokozódása és a szívizomszövet trofizmusának növekedése is, melyek mind közrejátszanak a megnövekedett szívérrendszeri rizikó kialakulásában.

Az érrendszer remodellingjének megítélésében az elasztikus paraméterek lehetnek a segítségünkre. Mindkét D-vitaminhiányos csoportban csökkent az elasztikus modulus azonos tangencionális stressz értékek mellett, melyet az elasztikus rostok arányának változása kísért.

Különböző mechanizmusok alakítják ki az inzulin rezisztenciát. Habár nem volt a 4 csoport között különbség az orális cukorterheléses vizsgálat éhomi vércukor és inzulin értékeiben, a T kezelés a magasabb 60 és 120 perces vércukor szinteket eredményezett a megfelelő inzulin szintek változása nélkül. D-vitaminhiányban az emelkedett inzulin szintek normoglikém állapotot tartottak fenn. A két kórállapot együttes fennállása esetén a HOMA-IR növekedését észleltük. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy két különböző mechanizmus állhat a folyamatok háttérében. Androgén túlsúly esetén az inzulin szintek nem követik a vércukorszint változásait, melynek háttérében a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek érzékenységében bekövetkező változás állhat. Ezzel szemben D-vitaminhiányban az inzulin elválasztás fokozott (hiperinzulinémia jelentkezik), mely képes a magasabb vércukorszinteket csökkenteni. Ezek a megfigyelések felvetik a két különböző módon működő, de egyszerre jelenlévő inzulin rezisztencia lehetőségét.

A két károsító hatás közül már egy jelenléte is elegendő volt ahhoz, hogy az arteriolákon az inzulin relaxációt jelentősen rontsa. Csak a „dupla kontrol” csoport mutatott megfelelő relaxációs választ. Az érrendszerben a „klasszikus” inzulin receptor aktivációt követően két szignáltranszdukciós út léphet működésben. A foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3-K) és a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) dependens út. A PI3-K út felelős az endotheliális NO produkció szabályozásáért, míg a MAPK dependens út olyan vazokonstriktor anyagok elválasztását növeli, mint az endothelin 1 (ET-1). Amennyiben a PI3-K út gátolt valami miatt, úgy lehetséges, hogy a MAPK út aktivációja révén nő az ET-1 produkció, mely vazokonstriktióhoz vezethet.

## **Következtetések:**

Az androgén túlsúly és D-vitaminhiány, valamint pótlás érrendszeri és anyagcserehatásait kívántuk megfigyelni PCOS patkánymodellünkben.

- **A 8 hetes transzdermális T kezelés és D-vitaminmentes éttrend sikeresen létrehozta nősténypatkányokban a kívánt PCOS fenotípust.**

Az alkalmazott transzdermális T kezelés sikeresen létrehozta a tipikus, a PCOS diagnózisához szükséges fenotípust. A D-vitaminpótlás részlegesen javította az androgén túlsúlyos csoportban az ovulációs arányt, azonban a petefészkekben a PCOS-re jellemző morfológia így is jelentkezett. Habár, a D-vitaminhiány nem volt közvetlen hatással a nemi hormonok szintjeire, az észlelt fenotípus mégis megfelelt a PCOS androgén túlsúlymentes, oligo-anovulációs fenotípusának. A két kórállapot együttes fennállása eredményezte a legrosszabb ovulációs rátát, melyből arra következtetünk, hogy a D-vitaminpótlás fontos része a fertilitási problémával küzdő PCOS-betegek kezelésének.

- **A D-vitaminhiány és az androgén túlsúly legfőbb anyagcsere hatásai egyszerre voltak vizsgálhatóak:**

Kísérletünkben a metabolikus szindróma és az inzulin rezisztencia már egy károsító hatás jelenlétében kialakult. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az androgén túlsúly fontos hatással van a testtömeg alakulására, melyet az irodalmi adatok is alátámasztanak (a hiperandrogén PCOS-betegek 75%-a túlsúlyos is). Sem a D-vitaminpótlás, sem a D-vitaminhiány önmagában nem befolyásolta szignifikánsan a testtömeg növekedését.

- **A D-vitaminhiány és a T kezelés az érfal morfológiai változását és elasztikus remodelingjét okozta.**

A D-vitaminhiány kisebb belső érsugarat és nagyobb falvastagságot eredményezett, melyet a T kezelés tovább rontott. Ugyan kutató csoportunk korábbi munkáiban a T kezelés hipertróf érfal átalakulást okozott, ezen vizsgálat eredményei ennek az ellenkezőjét látszanak igazolni. Az erek kontraktilis-relaxációs kapacitástartományát mind két hatás károsította, mely negatívan hat a balkamrai szöveti véráramlás fokozott metabolikus igények melletti adaptációjára. Az erek csökkent spontán tónusa és megnövekedett érfal rigiditása jellegzetes eltérés volt a D-vitaminhiányos csoportokban. Az erek elasztikus elemeinek változás mind D-vitaminhiányban, mint androgén túlsúlyban megfigyelhető volt, mely bizonyítékul szolgálhat az érfal korai remodelingjére.

- **A D-vitaminhiány és az androgéntúlsúly más módon vezet inzulin rezisztenciához.**

A D-vitaminpótlást kapott, T kezelt állatokban a magas posztprandiális vércukor értékek nem okoztak sem fokozott inzulin elválasztást, sem HOMA index változást. Az arteriolák inzulin relaxációja károsodott volt bármely kóros hatás esetén. A D-vitaminhiány a T kezeléstől függetlenül magasabb posztprandiális inzulin és HOMA index értékeket okozott, melyet az inzulin relaxáció romlása és magas érfali inzulin, valamint D-vitamin receptor sűrűség kísért. Ezek alapján feltételezzük, hogy a két kórállapotban két különböző inzulin rezisztenciával állunk szemben, melyek együtt tovább rontják az inzulin érválasztást.

Eredményeink megerősítik azt a megfigyelést, miszerint mind az androgén túlsúly, mind a D-vitaminhiány kedvezőtlen érrendszeri és anyagcserehatásokkal bírnak a koszorús erek rezisztencia arterioláin. Meg kell jegyeznünk, hogy tanulmányunk a korai változások bemutatására volt hivatott, így a hosszabb távú hatások felderítése hasznos lehet a jövőben. Eredményeink illeszkednek a vonatkozó szakirodalomba, melyek az androgén túlsúly és a D-vitaminhiány szerepét hangsúlyozták PCOS-ben. A két káros hatás együttes kezelése utat nyithat a nem kívánt anyagcsere és szívérrendszeri megbetegedések kockázatának csökkentéséhez.

## Publikációs lista:

### A doktori értekezés az alábbi publikációk alapján íródott:

1. **Hadjadj L**, Monori-Kiss A, Horváth EM, Heinzlmann A, Magyar A, Sziva RE, Miklós Z, Pál É, Gál J, Szabó I, Benyó Z, Nádasy GL, Várbíró S. (2019) Geometric, elastic and contractile-relaxation changes in coronary arterioles induced by Vitamin D deficiency in normal and hyperandrogenic female rats. *Microvasc Res*, 122: 78–84 IF: 2,604
2. **Hadjadj L**, Várbíró S, Horváth EM, Monori-Kiss A, Pál É, Karvaly GB, Heinzlmann A, Magyar A, Szabó I, Sziva RE, Benyó Z, Buday M, and Nádasy GL. (2018) Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency: Vascular consequences. *Diab Vasc Dis Res*, 15(4): 294-301 IF: 2,357

### További publikációk:

**Hadjadj L**, Pál É, Monori-Kiss A, Sziva RE, Korsós-Novák Á, Horváth EM, Benkő R, Magyar A, Magyar P, Benyó Z, Nádasy GL and Várbíró S. (2019) Vitamin D deficiency and androgen excess result eutrophic remodeling and reduced myogenic adaptation in small cerebral arterioles in female rats. *Gynecol Endocrinol*, 35(6): 529–534. IF: 1,406

Lajtai K, Nagy CT, Tarszabó R, Benkő R, **Hadjadj L**, Sziva RE, Gerszi D, Bányai B, Ferdinandy P, Nádasy GL, Giricz Z, Horváth EM, Várbíró S. (2019) Effects of vitamin D deficiency on proliferation and autophagy of ovarian and liver tissues in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Biomolecules*, 9(9): 471-485. IF: 4,694

Pál É\*, **Hadjadj L**\*, Fontányi Z, Monori-Kiss A, Lippai N, Horváth EM, Magyar A, Horváth E, Monos E, Nádasy GL, Benyó Z, Várbíró S. (2019) Gender, hyperandrogenism and vitamin D deficiency related functional and morphological alterations of rat cerebral arteries. *PLoS One*, 14(5): e0216951: 1-13. IF: 2,776

Pál É, **Hadjadj L**, Fontányi Z; Monori-Kiss A; Mezei Z; Lippai N; Magyar A; Heinzlmann A, Karvaly GB, Monos, E, Nádasy GL, Várbíró S. (2018) Vitamin D deficiency causes inward hypertrophic remodeling and alters vascular reactivity of rat cerebral arterioles. *PLoS One*, 13(2): e0192480, 1-16. IF: 2,776



## **Köszönetnyilvánítás:**

Ezt a vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézetében végeztük 2014 és 2015 között. Szeretném mindenekelőtt megköszönni **dr. Várbíró Szabolcsnak**, a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinka egyetemi docensének, témavezetőmnek azt a rengeteg áldozatot, segítséget és bátorítást mellyel végig kísérte és segítette munkámat a vizsgálat megtervezésétől egészen a disszertáció javításáig. Köszönöm **dr. Nádasy László Györgynek**, az Élettani Intézet egyetemi docensének azt a sok segítséget és jó tanácsot, mely nélkülözhetetlen volt a kutatás és a publikációk számára. Köszönöm **Dr. Benyó Zoltán** és **Dr. Monos Emil** professzor Úrknak, hogy mindig érdeklődéssel és türelemmel segítették a munkánkat, és lehetővé tették, hogy kísérleteinket elvégezhessük laborjaikban. Köszönöm **Dr. Gál János** professzor Úrnak, hogy lehetővé tette azt, hogy kutatómunkámat mint nappali hallgató végezhessem el. Köszönöm **dr. Monori-Kiss Annának** és **dr. Horváth Eszter Máriának** a sok szakmai segítséget és jó tanácsot, mellyel segítségemre voltak a vizsgálatok ideje alatt. Köszönöm **Murányi Ildikónak, Pál Évának, Sziva Réka Eszternek, Magyar Attilának, Heinzlmann Andreának, Buday Annának, Lénárt Lillának, Szekeres Máriának, Miklós Zsuzsannának, Karvaly Gellért Balázsnak, Patócs Attilának, Buday Mariannának, Tőkés Anna-Máriának, Korsós-Novák Ágnesnek, Magyar Péternek** és **Benkő Ritának** a munkám során nyújtott rengeteg közreműködést és segítséget. Szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni **férjemnek, Andrásnak és kislányomnak Elisának**, akik a legnagyobb áldozatot hozták azért, hogy ez a dolgozat megszülethessen. Köszönöm továbbá a családom és a barátok mindenkori biztatását.