

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar  
SZÜLÉSZETI ÉS SZAPORODÁSBIOLÓGIAI TANSZÉK ÉS KLINIKA

**A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1-es típusának kifejeződése kutya petefészekben**

Készítette: Haraszti Katalin

Témavezető: Dr. Müller Linda  
SZIE-ÁOTK, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika

Budapest

2013.

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	<b>3</b>
<b>2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ</b> .....	<b>4</b>
2.1. A 11-BÉTA-HIDROXISZTEROID-DEHIDROGENÁZ ENZIM 1-ES TÍPUSA .....	4
2.1.1. A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim.....	4
2.1.2. Az enzim szerepe általánosságban .....	5
2.1.3. Szerepe a zsírszövetben .....	7
2.1.4. Szerepe az elhízásban és elhízással kapcsolatos metabolikus betegségek kapcsán .	9
2.1.5. Szerepe a petefészekben.....	11
2.1.6. Szerepe a petefészek elváltozásai esetén.....	17
2.2. A 11-BÉTA-HIDROXISZTEROID DEHIDROGENÁZ ENZIM 1-ES TÍPUSÁNAK EXPRESSZIÓJA KUTYA SZÖVETEKBE.....	19
2.3. A PETEFÉSZEK SZÖVETTANA .....	20
2.3.1. A petefészek szövettani felépítése .....	20
2.3.2. A petefészek tüszőinek szövettana.....	21
2.3.3. A sárgatest szövettana .....	23
2.4. A 11-BÉTA-HIDROXISZTEROID DEHIDROGENÁZ ENZIM KIMUTATÁSI LEHETŐSÉGEI .....	24
2.4.1. Immunhisztokémia .....	24
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>26</b>
3.1. MINTAGYŰJTÉS .....	26
3.2. A MINTA BEÁGYAZÁSÁNAK LÉPÉSEI .....	26
3.3. AZ IMMUNHISZTOKÉMIAI VIZSGÁLAT MENETE .....	27
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>28</b>
<b>5. MEGBESZÉLÉS</b> .....	<b>32</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>35</b>
<b>7. SUMMARY</b> .....	<b>36</b>
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>37</b>
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>38</b>

## 1. BEVEZETÉS

Számos élettani folyamatban, így például a szénhidrát, fehérje és zsír anyagcserében, az immunológiai válasz kialakításában, vagy a reprodukzív folyamatok szabályozásában meghatározó szerepet tulajdonítanak a glükokortikoidoknak. Megfigyelték, hogy a mellékvese kéreg által termelt hormonok szöveti koncentrációja, illetve annak változása befolyásolja több szerv fiziológiai működését, és szerepet játszik különböző betegségek (elhízás, inzulinrezisztencia, magas vérnyomás, csontritkulás) kialakulásában.

A petefészekben a glükokortikoidok közvetlen hatást fejtenek ki a különböző sejtekre, továbbá gátolják a gonadotropinok hatását és a szteroidok bioszintézisét. A lokális glükokortikoid szintek változtatásában nagy szerepet tulajdonítanak a  $11\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz ( $11\beta$ -HSD) enzimeknek, amelyek a kortizol és kortizon metabolizmusát szabályozzák. Az enzimet számos faj szöveteiben kimutatták már. A  $11\beta$ -HSD 1-es izotípusa szövet specifikus módon a kortizon aktivációját vagy a kortizol inaktivációját is katalizálja, míg a 2-es izotípus csak az utóbbi folyamatban vesz részt.

A petefészekben a  $11\beta$ -HSD aktivitás szerepe sokrétű. Befolyásolja a petesejt érését, részt vesz a fejlődő tüszők védelmében, szabályozza a kortizol hatását a célsejtekre, elősegíti a gyulladáscsökkentő hatást és a felületi hám reparációját az ovulációt követően. Az enzimet emberek, patkányok, szarvasmarhák és sertések petefészek sejtjeiben írták le ezidáig.

Munkánk célja a  $11\beta$ -HSD1 enzim szöveti expressziójának vizsgálata volt, kutyából származó petefészek mintákon. A mintákat a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék Kisállatklínikáján gyűjtöttük. Összesen 17 műtétilag eltávolított petefészeket vizsgáltunk, amelyekből 8%-os pufferolt formaldehid oldatos fixálás és gépi szövet előkészítés után paraffinos blokkok, majd haematoxilinnal és eozinnal festett metszetek készültek. Az immunhisztokémiai vizsgálathoz  $11\beta$ -HSD1 ellenanyaggal (Abcam, rabbit polyclonal) és AEC (amino-etil carbasol) kromogénnel jelöltük a mintáinkat, amelyeket ezután fénymikroszkóp segítségével vizsgáltunk és értékeltünk ki. Eredményeinket más fajokban leírt tanulmányokkal hasonlítottuk össze.

## 2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

### 2.1. A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim 1-es típusa

#### 2.1.1. A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim

A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenázok mikroszómális enzimek, amelyek a rövid láncú alkohol dehidrogenázok családjába tartoznak. Nagy szerepet játszanak a lokális kortizol szintek változtatásában, és ezáltal az aktív szteroidok kortikoszteroid receptorokhoz való hozzáféréseben. Az elmúlt 15 év kutatásai rávilágítottak a glükokortikoidok receptorokhoz való kötődésük előtti metabolizmusának fontosságára, míg korábban csak a glükokortikoidok plazmaszintjét, a plazmafehérjékhez való kötődés mértékét és a receptorok sűrűségét tartották fontos tényezőnek (Sandeep és Walker, 2001).

A közelmúltban az enzim a vizsgálatok középpontjába került, mivel meghatározó szerepet tulajdonítanak neki egyes fiziológiás folyamatok lezajlásában, így a glükoneogenezisben, vazokonstriktióban, nátrium egyensúly fenntartásában, a szöveti fejlődésben és a szaporodási folyamatokban. Egerek gén deléciós kísérleteivel kimutatták, hogy az enzimnek fontos szerepe van a normál szérum glükokortikoid szintek fenntartásában, és a glükoneogenetikus májenzimek aktiválásában (Krosowski és mtsai, 1999).

A sejtek endoplazmatikus retikulumában elhelyezkedő 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenázok a lokális glükokortikoid ellátottság kulcsenzimek (Feldman és mtsai, 2013). Az aktív glükokortikoidok (kortizol és kortikoszteron) átalakítását katalizálják inaktív 11-keto metabolitokká (kortizonná és 11-dehidrokortikoszteronná). Eddig két izotípusát izolálták, azonban feltehetően további típusok is elkülöníthetőek (Krosowski és mtsai, 1999).

A 11-béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim 1-es típusát (11 $\beta$ -HSD1) 1989-ben mutatták ki először patkány májban, míg a biokémiaiilag eltérő tulajdonságú 2-es típust (11 $\beta$ -HSD2) öt évvel később juh és ember veseszövetben. Az 1-es típus a kortizon 11-keto csoportjának metabolikus aktivációját és a kortizol 11-béta-hidroxi csoportjának inaktivációját egyaránt katalizálhatja. Az oxidációs folyamatokhoz nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADP<sup>+</sup>), a redukciós folyamatokhoz NADPH+H<sup>+</sup>-t igényel kofaktorként (Hong-Yu Zhou és mtsai, 2012). Az enzimaktivitás iránya az endoplazmatikus retikulum hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz működésével képződött NADPH+H<sup>+</sup> szintjétől függ (Feldman és mtsai, 2013).

Ezzel szemben az enzim 2-es típusa csak a kortizol oxidációjában vesz részt, és a reakcióhoz nikotinamid-adenin-dinukleotidot ( $\text{NAD}^+$ ) használ kofaktorként. A  $11\beta$ -HSD2 a glükokortikoidok inaktivációja által védi a mineralokortikoid receptorokat a túlzott mértékű kortizol kötődéstől (Hong-Yu Zhou és mtsai, 2012).

### *2.1.2. Az enzim szerepe általánosságban*

A  $11\beta$ -HSD1 egy alacsony affinitású,  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  dependens enzim, amely elsősorban a biológiailag aktív kortizol lokális képződésében játszik szerepet. Számos szövetben előfordul, így a májban, a zsírszövetben, az agyban, a tüdőben, a vasculáris simaizomban, az elülső hypophysisben, az ivarszervekben és a mellékvese kéregben is kimutatható. A 2-es típusal ellentétben komplex szabályozás alatt áll. Az enzim szintézisét, aktivációját befolyásolják a glükokortikoidok, a stressz, a szexuáliszteroidok, a növekedési hormon, a citokinek és a peroxiszóma proliferátor által aktivált receptorok (Hong-Yu Zhou és mtsai, 2012).

A dexametazon fokozza, míg az inzulin csökkenti vagy nem hat a  $11\beta$ -HSD1 enzimaktivására. Patkány modellek segítségével kimutatták, hogy az LH és az FSH fokozza, a progeszteron pedig csökkenti az enzim kibocsátását. Ezen kívül megállapították a pajzsmirigy hormonok gátló hatását is az enzim működésére (Tomlinson és Stewart, 2001). Ösztrogén adása után hím patkányokban a  $11\beta$ -HSD1 mRNS-ének csökkent expresszióját és a glükokortikoid-függő glükoneogenetikus májenzimek aktivitás csökkenését figyelték meg (Sandeep és Walker, 2001). A gyulladáscsökkentő citokinek hatására fokozott expressziót és aktivitást írtak le. Különböző in vitro és in vivo modelleket vizsgálva arra jutottak, hogy a szabályozás szövet- és fajspecifikus. A növekedési hormon hatását akromegáliában és hipopituitarizmusban szenvedő embereken vizsgálták. Arra a következtetésre jutottak, hogy a növekedési hormon közvetlen módon alig hat a  $11\beta$ -HSD1 aktivitásra, viszont az IGF-1 specifikusan gátolja azt (Tomlinson és Stewart, 2001).

Sokáig vitatott volt, hogy a  $11\beta$ -HSD1 milyen irányban katalizálja a kortizon-kortizol átalakulást. A közelmúltban megállapították, hogy túlnyomó részt reduktáz funkciót tölt be, ha intakt sejtekben vagy szövetekben vizsgáljuk in vivo vagy in vitro körülmények között. Ezt figyelték meg például a májban, zsírszövetben, neuronokban, vasculáris sima izmokban (Sandeep és Walker, 2001). Azonban egyes sejtkultúrákban, mint például a patkány Leydig

sejtjeiben, emberi cseplész stroma sejtjeiben elsősorban oxidáz funkciót tölt be az enzim. Oxidáz aktivitás figyelhető meg ezen kívül a sejtek sérülésekor is, illetve, ha NADP<sup>+</sup>-t adunk kofaktorként. Az, hogy melyik folyamatot katalizálja a 11 $\beta$ -HSD1, a sejtek egyes fejlődési szakaszaiban is változhat. Erre példa az emberi zsírszövet, ahol a prekursor sejtekben elsősorban oxidázként, érett zsírsejtekben azonban már reduktázként működik az enzim (Hong-Yu Zhou és mtsai, 2012).

Feltehetően az enzim reduktáz aktivitása a legfontosabb a lokális glükokortikoid szint fenntartásában még alacsony plazma kortizol szintek esetén is. Ezt igazolták a májban, ahol a legnagyobb mennyiségben történik az aktív glükokortikoidok termelése inaktív 11-keto metabolitokból. Az emberi májban a centrális véna körül mutatták ki az enzim nagyfokú expresszióját, míg a májartéria, portális véna és epevezeték körül nem lehetett kimutatni.

A 11 $\beta$ -HSD1 aktivitás hatásait a májban egereken végzett gén deléciós vizsgálatok alapján írták le. A homozigóta mutánsok nem tudták átalakítani a 11-dehidrokortikoszteront és gyengébb választ adtak a glükoneogenetikus májenzimek aktivációjának hatására. Ez feltehetően májbeli glükokortikoid hiányhoz vezetett, ami fokozta a lipidek oxidációját. Ezen kívül ezek az egerek ellenálltak az általában stressz vagy elhízás okozta hiperglikémiának is (Krosowski és mtsai, 1999).

A 11 $\beta$ -HSD 1-es típusa fontos szerepet játszik a központi idegrendszerben is. Az agyban a glükokortikoidok hatással vannak a sejtanyagcserére, elektrofiziológiai tulajdonságok, neuroendokrin paraméterek alakulására, a hangulatra, memóriára, sejtosztódásra, sejtek érésére, felépítésére és túlélésére. A 11 $\beta$ -HSD1 enzim megjelenik a hippocampus, a hypothalamus és az elülső hypophysis neuronjaiban. 11 $\beta$ -HSD1 hiányos egereken végzett tanulmányok támasztják alá, hogy az enzim fokozza a krónikus glükokortikoid többlet káros hatásait és hogy szelektív 11 $\beta$ -HSD1 gátlók alkalmazása védheti a korral csökkenő hippocampalis funkciót. Ezen kívül az enzim befolyásolhatja a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely negatív feedback szabályozását az endogén glükokortikoid szintek beállítása által. 11 $\beta$ -HSD1 hiányos egerekben mellékvesekéreg hypertrophiát és fokozott ACTH-ra adott választ figyeltek meg in vitro körülmények között (Sandeep és Walker, 2001).

Más szövetekben is kimutatták, hogy a glükokortikoid szintek változtatása befolyásolja a szerv működését. Ezt tapasztalták például a petefészekben (ahol úgy gondolják, hogy az enzim jelenléte a sikeres embriótranszfer ellen hat) és az érrendszerben (ahol a prosztaciklin produkcióra lehet hatással az aorta endothel sejtjeiben). Ezen kívül jelentős

mennyiségű 11 $\beta$ -HSD1 található az emberi mellékvese kéregben, valamint a juh és patkány vesében (Krosowski és mtsai, 1999). Az enzim szerepet játszik a simaizom szövetben a makrofágok differenciálódásában, és a közelmúltban kimutatták az enzimet a csontokban is. A glükokortikoidok által indukált osteoporosis terápiájában eredményes lehet a 11 $\beta$ -HSD1 enzim gyógyszeres gátlásának alkalmazása (Feldman és mtsai, 2013).

### *2.1.3. Szerepe a zsírszövetben*

A glükokortikoidok jelentős mértékben befolyásolják a szénhidrát, zsír- és fehérje anyagcserét (Napolitano és mtsai, 1998), modulálják az immunrendszert és a stresszre adott válaszreakciókat (Feldman és mtsai, 2013). Fokozzák a májban zajló glükoneogenezist és a zsírsejtekben lejátszódó lipolízist, szubsztrátokat biztosítanak a proteolízis támogatásával és közvetlenül gátolják az inzulin szekréciót a hasnyálmirigy béta sejtjeiben.

A zsírszövetre jellemző, hogy sajátosan érzékeny a glükokortikoid hatásra. A zsigeri zsírszövet és az inzulin rezisztencia közötti összefüggést a megváltozott helyi szteroid érzékenység idézheti elő, amiben központi szerepe van a 11 $\beta$ -HSD1-nek.

A célszövet a 11 $\beta$ -HSD1 kibocsátása révén maga szabályozza a glükokortikoidok koncentrációját és érzékenységét a receptor kötődéshez. Ez különösen fontos a metabolikusan aktív szövetekben, ahol a glükokortikoidok funkcionálisan gátolják az inzulinhatást (Stulnig és Waldhäusl, 2004).

A 11 $\beta$ -HSD1-et kódoló mRNS-t kimutatták az összes nagyobb zsírdepóban, májban, lépben, vesében. Legkisebb mértékben a vese és a máj körüli depókban, legnagyobb mennyiségben a bőr alatti, csepleszi és nemi szervek körüli zsírraktárakban. Nagyobb kibocsátást figyeltek meg a csepleszben szukáknál, mint kan kutyáknál. Emberekben kimutatták, hogy a cseplesz zsírsejtjeiben magasabb az enzim aktivitása és kibocsátása a bőr alatti zsírsejtekhez képest. Ezzel szemben kutyákban nem volt megfigyelhető különbség a cseplesz és a bőr alatti zsírraktárak gén expressziója között, habár mindkettőben nagyobb mértékű volt, mint a többi visceralis zsírdepóban. A faji különbség oka egyelőre ismeretlen. A zsírszövetben a sejtek differenciálódása során végig kimutatható volt a 11 $\beta$ -HSD1 kibocsátás. Legnagyobb mennyiségben a pre-adipocytákban, az érésük során egyre csökkenő mennyiségben (Ryan és mtsai, 2011).

Csepleszből származó frissen izolált humán preadipocytákat vizsgálva megállapították, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 főleg a kortizol inaktivációját katalizálja, tehát oxidatív hatású. A glükokortikoidokat aktiváló reduktáz funkció csak a csepleszi zsírsejtek differenciálódása során dominál, a bőr alatti zsírszövet sejtjeiben nem. A 11 $\beta$ -HSD1 reduktáz aktivitásra való áttérését a megváltozott mikroszomális NADPH:NADP<sup>+</sup> arány következtében kialakult redoxpotenciál változás okozhatja. A humán preadipocyták érése során végbemenő dehidrogenáz-reduktáz aktivitás változását a hexóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitás fokozódása kíséri. A hexóz-6-foszfát dehidrogenáz katalizálja a pentóz-foszfát ciklus első lépéseit, ezáltal NADPH-t termel és szabályozza a mikroszomális redoxpotenciált.

A dehidrogenáz-reduktáz aktivitás megváltozásának meghatározott ideje az adipogenesis során jelentős hatást gyakorolhat a viscerális elhízás kifejlődésére. A zsírszövet megszorodása a preadipocyták proliferációjától, differenciálódásától és a zsírsejtek lipid felhalmozódás következtében létrejött méretnövekedésétől függ. A kortizol gátolja a sejtek proliferációját, és támogatja a zsírsejtek differenciálódását. A preadipocytákban a kortizol inaktiváló dehidrogenáz aktivitás elősegítheti a proliferációt, és autokrin módon gátolja a differenciációt. A kortizon-kortizol átalakulás egyúttal parakrin módon is hathat és a zsigeri zsírszövetben a zsírsejtek érése gátolhatja a proliferációt és elősegítheti a szomszédos preadipocyták differenciálódását. A kortizol fokozza az adipogenezist és a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitást a preadipocytákban, ahol a 11 $\beta$ -HSD1 a kortizon kortizollá alakításával hozzájárulhat a zsírsejtek differenciálódásához (Stulnig és Waldhäusl, 2004).

A kutyák bőr alatti zsírszövetében a gyulladással mediátorok (lipopoliszacharid és tumor nekrosis faktor  $\alpha$ ) fontos stimuláló hatásukat állapították meg a 11 $\beta$ -HSD1 gén expressziójára. Emberek illetve kutyák zsírsejtjeit tumor nekrosis faktor  $\alpha$ -val kezelve, jelentős növekedést figyeltek meg a génexpresszióban. A tumor nekrosis faktor  $\alpha$ -ra adott válasz nagyobb volt a bőr alatti, mint a visceralis zsírsejtekben, ami az egyes zsírraktárakból származó sejtek közötti különbséget tükrözi. Hasonlóképpen a lipopoliszacharidokkal való kezelés is fokozta a génexpresszót. Míg az interleukin-6 kutyákban, az emberekkel ellentétben nem fokozta a 11 $\beta$ -HSD1 termelést, a dexametazonnal való kezelés jelentős idő-és dóziszfüggő emelkedést eredményezett (Ryan és mtsai, 2011).

Az inzulin feltehetően csökkenti a 11 $\beta$ -HSD1 aktivációját, viszont azt tapasztalták, hogy stimulálja a zsírsejtek differenciálódását. Az inzulin ellensúlyozza a tumor nekrosis faktor  $\alpha$  stimuláló hatásukat, azonban kisebb inzulinérékenység esetén kevésbé képes azt gátolni. Az ösztrogének is képesek elnyomni a 11 $\beta$ -HSD1 kibocsátást, ami valószínűleg



hozzájárul a metabolikus és kardiovaszkuláris hatások kialakulásához (Stulnig és Waldhäusl, 2004). Leírták, hogy nőkben a 17-ösztadiol erőteljesen stimulálja a 11 $\beta$ -HSD1 kibocsátást a visceralis preadipocytákban. Az emberekhez hasonlóan a kutyák zsírraktáraiban is fontos szerepet játszanak a szexuálissteroidok a helyi kortizol termelés kontrolljában. A zsírszövet a gyulladáskeltő citokinek egyik fontos forrása. Úgy gondolják, hogy ez kapcsolatot biztosít az elhízás, inzulin rezisztencia és a metabolikus szindróma között (Ryan és mtsai, 2011).

#### *2.1.4. Szerepe az elhízásban és elhízással kapcsolatos metabolikus betegségek kapcsán*

Az elhízás összefüggésbe hozható a megnövekedett kortizol szekrécióval. Az érintett egyedekben a plazma kortizol szintje azonban nem magasabb, mint a normál testsúlyú személyekben, hanem általában alacsonyabb. Ez arra utal, hogy a kortizol perifériás metabolizmusa fokozódik elhízás esetén, így hajlamos alacsonyabb plazma kortizol koncentráció kialakulására. Ez a negatív feedback károsodása révén az ACTH szekréció elnyomását és fokozott kortizol szekréciót eredményez.

Leptinre rezisztens elhízott patkányokon végzett kísérletek kimutatták, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitás a májban csökken, azonban a cseplesz zsírszövetében fokozódik. Hasonlóképpen elhízott emberekben csökkent a szájon át felvett kortizon átalakulása kortizollá a plazmában, ellenben jelentősen nőtt az enzim aktivitása a bőr alatti zsírszövetben. Így egy szövet specifikus reguláció zavar áll fenn a 11 $\beta$ -HSD1 működésében elhízás esetén, amelynek a pontos mechanizmusa azonban még nem tisztázott (Sandeep és Walker, 2001).

A bőr alatti zsírszövet 11 $\beta$ -HSD1 mRNS expressziója és az elhízás mértéke közötti összefüggést vizsgálva ellentmondásos eredményeket kaptak. In situ hibridizációs módszerrel egyenes arányosságot találtak, más kutatók azonban PCR segítségével fordított eredményre jutottak. A zsírszövet kortizol koncentrációjával kapcsolatosan azonban egyik tanulmány sem igazolt összefüggést (Feldman és mtsai, 2013).

Elhízás esetén testszerte csökken a 11 $\beta$ -HSD1 aktivitás, azonban a zsírszövetben nő. A kortizol gátolja a csepleszben a preadipocyták proliferációját. Így a cseplesz éretlen zsírsejtjeiben megfigyelt dehidrogenáz aktivitás a kortizol szint csökkentése révén fokozott proliferációt eredményezhet, ami elősegítheti a zsigeri zsírraktárak növekedését. Elhízott betegekből származó zsigeri preadipocyták emelkedett 11 $\beta$ -HSD1 aktivitása azt eredményezi, hogy magasabb kortizol szint szükséges (a megnövekedett inaktiváló aktivitás miatt) a sejtek

érett adipocitákká válásához, így az enzim redukzív aktivitásának eléréséhez, ami a zsírszövet túlszaporodásához vezethet (Stulnig és Waldhäusl, 2004).

Elhízott emberekben magasabb a  $11\beta$ -HSD1 gén expressziója és az enzim aktivitása mind a visceralis, mind a bőr alatti zsírszövetben, mint normál súlyú személyekben. Ugyanerre az eredményre jutottak elhízott illetve sovány patkányok cseplezsi zsírját vizsgálva. Az enzimaktivitás változásának az oka még nem teljesen tisztázott. A zsigeri zsír fokozott  $11\beta$ -HSD1 expressziója összefüggésben van a hipoadiponectinémiával, aminek szerepe lehet az elhízással kapcsolatos csökkent inzulin érzékenység kialakulásában (Ryan és mtsai, 2011).

$11\beta$ -HSD1 hiányos egerekben fokozott inzulin érzékenységet figyeltek meg, ezen kívül azt tapasztalták, hogy a magas zsírtartalmú diéta sem okozott elhízást. Ezzel szemben a túl sok enzimet termelő kísérleti állatokban az emelkedett lokális glükokortikoid szint következtében elhíztak az egerek (Feldman és mtsai, 2013).

Az inzulin rezisztenciát súlyosbíthatja az elhízás, de számos más rendellenesség (2-es típusú diabetes mellitus, policisztás ovárium szindróma, magas vérnyomás, felnőttek növekedési hormon hiánya) ugyancsak fontos jellemzője (Sandeep és Walker, 2001).

Glükokortikoid receptorokat túlzott mértékben termelő kísérleti egerekben az inzulin termelésének csökkenését állapították meg. A  $11\beta$ -HSD1 közvetlen módon szabályozza a glukagon szekrécióját a hasnyálmirigy alfa sejtjeiben. A glükokortikoid termelés parakrin módon hat a szomszédos béta sejtekre, és csökkent inzulintermelést eredményez (Feldman és mtsai, 2013).

Emberi zsírsejtekben az inzulin stimulálja a differenciálódást, ami együtt jár a  $11\beta$ -HSD1 aktivitás fokozásával. Ezért a  $11\beta$ -HSD1 szabályozás zavarára lehet számítani minden olyan betegségben, ami az inzulin aktivitás megváltozásával jár (Sandeep és Walker, 2001).

A zsírszövetben megfigyelt fokozott aktivitás magasabb helyi kortizol szintet jelez. Függetlenül attól, hogy a kortizol metabolizmus változása elsődleges vagy másodlagos az elhízás esetén, a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengelyre és a glükokortikoid receptorok aktivitására gyakorolt hatása kulcsfontosságú lépés lehet az elhízás káros metabolikus következményeihez vezető úton. Emiatt vonzó lehetőségként jelenik meg a gyógyászati beavatkozás, amellyel visszafordítják a szövet specifikus változásokat a kortizol metabolizmusban (Walker és Stewart, 2003). A  $11\beta$ -HSD1 enzim termelésének vagy működésének gyógyszeres befolyásolása ígéretes terápia lehet az elhízás, cukorbetegség vagy a csontritkulás kezelésében (Feldman és mtsai, 2013).

A legfontosabb terápiás javaslat, ami felmerül a 11 $\beta$ -HSD vizsgálata során, az az elképzelés, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 szelektív gátlói csökkenthetnék a májbeli és zsírszövetbeli kortizol koncentrációkat, és ezáltal fokozhatná az inzulin érzékenységet, csökkenthetné a glükoneogenezist és esetleg csökkenthetné az elhízást is. Ez a kezelés alkalmazható lenne inzulin rezisztenciában, elhízásban vagy hiperglikémiában szenvedő betegeknél (Sandeep és Walker, 2001). A 11 $\beta$ -HSD1 farmakológiai gátlása egészséges és 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő embereknél májbeli glükokortikoid szint csökkenést okoz, ami a máj csökkent glükóz termelését és fokozott lipid katabolizmust eredményez (Walker és Stewart, 2003).

Az elhízás szoros összefüggésben áll a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával, amely a célszövetek (zsír, máj, izom) inzulin érzékenységének csökkenésével áll kapcsolatban. Ebben a 11 $\beta$ -HSD1-nek nagy szerepe van a perifériás inzulin érzékenység, és az inzulin szekréció gátlása révén. A zsigeri elhízás és az inzulin rezisztencia okozati összefüggését a közelmúltban bizonyították elhízott patkányok mellékhere és vese körüli zsírpárnáinak sebészi eltávolításával. Ez a lépés jelentősen javította a máj inzulin érzékenységét és csökkentette a máj glükóz termelését.

Diabetesez betegekben csökken a kortizol termelés, de a bőr alatti zsírszövetben nem tapasztaltak változást a 11 $\beta$ -HSD aktivitásban. A zsírszövet kortizol metabolizmusának és/vagy glükokortikoid érzékenységének rendellenességei hozzájárulhatnak az inzulin rezisztenciához és ezáltal a 2-es típusú cukorbetegség és a metabolikus szindróma egyéb megnyilvánulási formáinak kialakulásához (Stulnig és Waldhäusl, 2004).

#### *2.1.5. Szerepe a petefészekben*

Az elmúlt évtizedben a 11 $\beta$ -HSD enzim izotípusait számos sejtben kimutatták a petefészekben, így a petesejtben, a cumulus oophorus sejtjeiben, a granulosa sejtekben, a theca sejtekben, a granulosa lutein sejtekben, a sárgatestben és a petefészek felületi hámsejtjeiben (Thurston és mtsai, 2003c). Meggyőző adatok állnak rendelkezésre az enzim kifejeződésére például patkányok petesejtjeiben, ahol mind a 11 $\beta$ -HSD1 mRNS, mind a fehérje igen nagy mennyiségben megtalálható (Michael és mtsai, 2003). Az enzim jelenlétét immuncitokémiai és in situ hibridizációs módszerekkel igazolták proösztuszos patkányok petesejtjeiben és sárgatestjeiben (Tetsuka és mtsai, 1999).

## Petesejt

Embereknél hasonlóképpen  $11\beta$ -HSD1 termelést figyeltek meg a petesejtben és a sárgatest lutein-granulosa sejtjeiben. Nem tudták azonban kimutatni a  $11\beta$ -HSD1 enzimet a preovulációs tüsző granulosa vagy theca sejtjeiben, ezekben a sejtekben csak az enzim 2-es típusa jelent meg (Ricketts és mtsai, 1998).

A petefészek sejtjei nem képesek a glükokortikoidok szintézisére, azonban a  $11\beta$ -HSD által katalizált metabolizmusnak köszönhetően itt is lehetőség van kortizol képződésre. Úgy gondolják, hogy ez a kortikoszteroid fontos szerepet játszhat a petesejt fejlődésének végső szakaszában. Ezt a feltevést támasztja alá a petesejt érése és a tüszőfolyadék kortizol szintje között megfigyelt pozitív összefüggés (Hillier és Tetsuka, 1998). Számos gerinces fajban a kortizol, 11-deoxikortizol és a hozzájuk kapcsolódó progeszteron metabolitok serkentik a petesejt érését, fejlődési potenciálját. Ezt az összefüggést figyelték meg emberben is. Ezzel ellentétben sertések petesejtjeit vizsgálva azt találták, hogy a glükokortikoidok gátolják a meiotikus fejlődést (Michael és mtsai, 2003).

## Folikuláris hámsejtek

A glükokortikoidok serkentő és gátló hatást fejthetnek ki a petefészekben fejlődő tüszők többi sejtjére is (Tetsuka és mtsai, 2010). Közvetlenül hatnak a petefészek follikuláris hámsejtjeire, gátolják a gonadotropinok hatását ezeken és a szteroidok szintézisét ezekben a sejtekben (Michael és mtsai, 2003). Fokozzák az FSH által stimulált progeszteron termelést patkány és tehén granulosa sejtekben, az androgén termelést tehének theca sejtjeiben és az oxitocin termelést tehén granulosa sejt kultúrákban. Ezen kívül kimutatták, hogy a glükokortikoidok elnyomják a P450 aromataz enzim aktivitását és csökkentik az LH receptorok számát patkányokban, tehenekben és sertésben, ami által káros hatást fejtenek ki a tüsző érésére. Így az enzim glükokortikoidokat inaktiváló, dehidrogenáz/oxidáz aktivitása fontos lehet a fejlődő tüszők védelmének biztosításában (Tetsuka és mtsai, 2010).

A szarvasmarhák antralis tüszőinek granulosa sejtjei csak  $11\beta$ -HSD1-et kódoló mRNS-t tartalmaznak,  $11\beta$ -HSD2-t nem tudtak kimutatni (Michael és mtsai, 2003). Megállapították, hogy tehenekben és sertésekben a granulosa sejtekben fokozódik a glükokortikoidok inaktivációja a tüszőérés folyamán, vagyis az enzim oxidatív aktivitással bír ezekben a sejtekben (Thurston és mtsai, 2007). A tehének sárgatestjeiben, a luteinizálódott granulosa sejtekben már az enzim mindkét izotípusa termelődik. Az 1-es típus az aktív sárgatestben, a 2-es a sorvadó corpus albicansban uralkodó. Az enzim kibocsátása változik a

funkcionális aktivitás változásával, de teheneknél nem jelentkezik a más fajokban megfigyelt abszolút átállás  $11\beta$ -HSD2 termelésről  $11\beta$ -HSD1-re az ovulációt követően. Tehenek antralis tüszőiben az ösztadiol szintézis nem befolyásolja a  $11\beta$ -HSD2 expressziót, és a sárgatestben ösztadiol hiányában, progeszteron jelenlétében termelődik az enzim 2-es típusa (Michael és mtsai, 2003). Szarvasmarhák petefészkében a granulosa sejtek által termelt  $11\beta$ -HSD1 inkább dehidrogenázként működik, nem reduktázként. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a tüszőérés során fokozódó androgén és ösztrogén termelés is NADPH-t igényel hidrogén donorként, és így csökken a NADPH: NADP<sup>+</sup> arány a preovulációs tüszőben (Tetsuka és mtsai, 2010). A  $11\beta$ -HSD1 in vitro körülmények között NADP<sup>+</sup> illetve NADPH jelenlétében mind a kortizol oxidációjára, mind a kortizon redukciójára képes. In vivo körülmények között megfelelő kofaktor jelenlétében azonban általában NADPH-dependens 11-ketoszteroid reduktázként funkcionál és a kortizol átalakítását katalizálja kortizonná, vagyis inaktivál (Thurston és mtsai, 2003a).

Emberekben és patkányokban a preovulációs tüszők granulosa sejtjei  $11\beta$ -HSD2-t termelnek. Ezeknél a fajoknál az enzim 2-es izotípusa, a kortizolt inaktiválva védi meg a tüszőket a glükokortikoidok szuppresszív hatásától. A humán granulosa sejtekben  $11\beta$ -HSD2 mRNS expresszió mutatható ki a tüsző fázis során, majd a luteinizációt követően az enzim 1-es típusának mRNS-e termelődik (Thurston és mtsai, 2003c). Ez a változás a receptorok változásával állhat összefüggésben: a tüszők granulosa sejtjein mineralokortikoid receptorok, míg a luteinizált sejteken glükokortikoid receptorok jelennek meg (Michael és mtsai, 2003). Az FSH dózisfüggő módon fokozza a  $11\beta$ -HSD1 termelődését, a 2-es típusra azonban nem hat. Az egészséges tüszőkben a  $11\beta$ -HSD1 mRNS expresszió fokozódik a tüszőérés során a granulosa és a theca interna sejtekben egyaránt. Ezzel szemben a  $11\beta$ -HSD2 expresszió és a glükokortikoid receptor kifejeződés igen alacsony szintű és nagyrészt változatlan marad. Az atretizálódó tüszőkben drasztikus  $11\beta$ -HSD2 növekedést figyeltek meg mind a granulosa, mind a theca interna sejtekben (Tetsuka és mtsai, 2010). A  $11\beta$ -HSD enzim szerepe tehát az, hogy szabályozza a kortizol hatásait annak célsejtjeire (Evagelatou és mtsai, 1997). A granulosa sejtek enzim termelése nagyban függ a fenotípustól és a sejtek differenciálódásától. Kimutatták, hogy a granulosa sejtek az LH-csúcsot, így az ovulációt megelőzően  $11\beta$ -HSD2-t kódoló mRNS-t és mineralokortikoid receptorokat expresszálnak (Michael és mtsai, 2003). Egyes szteroid hormonok direkt vagy indirekt módon gátolják a  $11\beta$ -HSD enzimet. A helyileg termelődött ösztadiol elnyomja az enzim hatását, a tesztoszteron fokozza az aktivitást

(Evagelatou és mtsai, 1997). A progeszteron elnyomja a  $11\beta$ -HSD2, illetve támogatja a fokozatosan emelkedő  $11\beta$ -HSD1 kibocsátást a luteinizálódó sejtekben.

A progeszteron szerepét vemhes patkányok sárgatestében tanulmányozták. A  $11\beta$ -HSD1 expresszió a vemhesség utolsó napján volt a legmagasabb, amikor a sárgatest funkcionális regresszió ment keresztül. A legegyszerűbb magyarázat erre a megfigyelésre az volt, hogy a luteinizáció során a fokozódó  $11\beta$ -HSD1 és csökkenő  $11\beta$ -HSD2 termelés progeszteronfüggő. A luteális regresszióval csökkenő progeszteron kibocsátás  $11\beta$ -HSD1 csökkenést és  $11\beta$ -HSD2 szint emelkedést okozott (Michael és mtsai, 2003).

A granulosa sejtek  $11\beta$ -HSD1 mRNS szintje és a tüszőfolyadék kortizol koncentrációja között negatív korrelációt figyeltek meg teheneiben (Tetsuka és mtsai, 2010). A tüszőérés során a kortizol koncentráció növekedik a tüszőfolyadékban, ami a  $11\beta$ -HSD1 enzim reduktáz aktivitásának fokozódását és a kortizol inaktiváció csökkenését tükrözheti. Ezen kívül lehetséges, hogy a megfigyelt növekedés a szabad kortizol szintben arra utal, hogy a progeszteron nagyobb mértékben szorítja ki a kortizolt a kortikoszteroidkötő globulinokról, mint a tüszőérés kezdeti stádiumaiban (Thurston és mtsai, 2003a). Ez a kapcsolódás azt is magyarázhatja, hogy miért ennyivel magasabb a kortizol szint a tüszőfolyadékban, mint a perifériás szérumban (Rae és Hillier, 2005). Spontán ovuláló nőkben megfigyelték, hogy a tüszőfolyadék teljes és szabad kortizol szintje egyaránt növekszik az ovulációt kiváltó LH csúcsot követően. A megfigyelést a magas  $11\beta$ -reduktáz aktivitással, fokozott  $11\beta$ -HSD1 és csökkent  $11\beta$ -HSD2 termeléssel magyarázzák (Tetsuka és mtsai, 1999).

Kimutatták, hogy nők, tehének és sertések tüszőfolyadéka legalább két olyan vegyületet tartalmaz, amely szelektíven képes módosítani a NADP(H)-dependens  $11\beta$ -HSD1 aktivitását. A follikuláris folyadékban található egy hidrofil vegyület, amely akár háromszorosára is fokozhatja a  $11\beta$ -HSD1 aktivitást egy órán belül, és egy hidrofób komponens, amely akár 84%-kal csökkentheti az enzim hatását (Michael és mtsai, 2003).

Régebbi vizsgálatokban fordított összefüggést találtak a petefészek  $11\beta$ -HSD aktivitása és a fogantatás valószínűsége között gonadotropin indukálta in vitro fertilizáció (IVF) esetén, azonban később hasonló vizsgálatok során már nem találtak ilyen összefüggést. Ezt követően a figyelem a tüszőfolyadék kortizol: kortizon arányára terelődött. Arról számoltak be, hogy a nagy intrafollikuláris kortizol: kortizon arány (összhangban az alacsony  $11\beta$ -HSD aktivitással) összefüggésbe hozható a teherbe esés megnövekedett valószínűségével akár gonadotropin által stimulált, akár természetes ciklusú IVF esetén. Így a nagy intrafollikuláris kortizol koncentrációk jelezhetik akár egyszerűen azokat az IVF ciklusokat,

amelyekben sikeresen indukálták a megfelelő tüsző és petesejt érését. Ezen kívül megállapították, hogy az IVF-et követő fogantatás fokozott valószínűsége összefüggésbe hozható az alacsony hidrofíil  $11\beta$ -HSD1 stimulátor, és magas hidrofób inhibitor szintekkel és a magas intrafollikuláris kortizol: kortizon aránnyal, amelyek mindegyike alacsony kortizol oxidációt jelez a petefészekben. Ezzel szemben a magas stimulátor, alacsony inhibitor szint, csökkent tüszőbéli kortizol: kortizon arány a  $11\beta$ -dehidrogenáz aktivitást indukálja és a sikertelen IVF ciklusára jellemző (Thurston és mtsai, 2003c). Mivel a petefészek  $11\beta$ -HSD aktivitása csupán enyhén befolyásolja a petesejt IVF-ját, arra a következtetésre jutottak, hogy a granulosa lutein sejtek  $11\beta$ -HSD aktivitása a fertilizáció utáni fejlődést tükrözheti (Michael és mtsai, 2003). Kimutatták, hogy a leukociták jelenléte növeli a  $11\beta$ -HSD aktivitást, hozzájárulhat az enzim szabályozásához, és így a sikeres terhességhez IVF esetén.

A petefészek makrofágokat és kisebb számban egyéb leukocitákat is tartalmaz. Ezek a sejtek citokineket termelnek, amelyek képesek a petefészekben zajló szteroidogenezist szabályozni. Kimutatták, hogy a leukociták a citokin szekréción keresztül kölcsönhatásba lépnek a petefészek sejtjeivel, és ez a sejt-sejt kapcsolat a  $11\beta$ -HSD aktivitás fokozódásához vezet a humán granulosa sejtekben. A főként immunsejtekből felszabaduló citokinek befolyásolják a neuroendokrin rendszert és az ivari funkciót. Számos citokin (például az interleukin-4, interleukin-5, interleukin-6, interferon- $\alpha$ ) közvetlenül hat a szteroid hormontermelésre. Az interleukin-1 fokozza a sejtproliferációt és gátolja a szteroid szintézist, így a granulosa sejtek progeszteron, granulosa-lutein sejtek ösztadiol termelését. Az interleukin-2 hatása változatos a stimuláció típusától és a sejtek forrásától függően. Fontos megjegyezni, hogy a granulosa sejtek gátolhatják az interleukin termelést, és hogy egy citokin kibocsátása stimulálhatja vagy fokozhatja egyéb citokinek termelését. A citokinek és fehérvérsejtek megfigyelt hatásait komplex celluláris kölcsönhatások határozzák meg és a sejtek száma, természete és differenciációs állapota, citokinek koncentrációja és az ezt szabályozó feedback mechanizmus befolyásolja (Evagelatou és mtsai, 1997).

Kimutatták, hogy az LH és az interleukin-1 indukálja a  $11\beta$ -HSD1 mRNS expresszióját patkány granulosa sejtjeiben és humán felületi epithel sejtekben a petefészekben (Thurston és mtsai, 2003a). Mivel a  $11\beta$ -HSD1 termelést az LH és a gyulladásos interleukinek fokozzák a granulosa sejtekben, a glükokortikoid szintézis az ovuláció gyulladásos kaszkádjának szerves részeként fokozódhat a gonadotropinok és a citokinek hatására. Ezzel összhangban a tüszőfolyadék kortizol koncentrációja emelkedik a preovulációs LH csúcsot követően (Michael és mtsai, 2003).

A petefészek szteroid hormon szintézisének főbb helyei a preovulációs tüsző és a sárgatest. A szteroidogenezist a gonadotropinok szabályozzák, amelyek befolyásolják a tüszőnövekedést, ovulációt, luteinizációt.

#### Interstitium, epithel sejtek

Az ovuláció egy akut gyulladásos válasznak tekinthető, amelyet a lokálisan termelődő citokinek közvetítenek. Ezek a vegyületek a 11 $\beta$ -HSD1-et kódoló gén stimulációjával aktiválják a gyulladáscsökkentő hatású kortizolt a petefészek felületi epithel sejteiben in vitro körülmények között. A kortizol tovább növeli saját képződését a citokin által indukált 11 $\beta$ -HSD1 és glükokortikoid receptor gének expressziójának fokozásával. Így a gyulladást gátló kortizol aktiválása a petefészek felületén különösen fontos lehet az ovulációnál (Rae és Hillier, 2005). Az ovuláció emelkedett interleukin, prosztaglandin és gonadotropinok által indukált 11 $\beta$ -HSD1 szintézissel jár. A reduktáz aktivitással rendelkező 11 $\beta$ -HSD1 által fokozott glükokortikoid termelés az ovuláció során élettani mechanizmus lehet a petefészek gyulladásos folyamatainak korlátozására, mivel a glükokortikoidok gátolják a prosztaglandinok és a pro-inflammatorikus citokinek szintézisét a petefészekben. Az ovuláció során kollagenolízis és szöveti átalakulás figyelhető meg a felületi hámban, amely az epithel sejtek apoptosissal jár. A felületi epithel sejtekben a 11 $\beta$ -HSD1 részt vesz a helyi kortizol termelésben az ovuláció környékén, ami elősegíti a fokozott gyulladáscsökkentő és felületi reparáló mechanizmust (Michael és mtsai, 2003).

A petefészek felületi hámja egyrétegű mesothelialis lap illetve köbhámsejtekből áll és a petefészek teljes felületére kiterjed. Ez a dinamikusan változó sejtréteg minden tüszőrepedéskor megsérül, majd helyreáll. Az ovuláció proteolitikus kárt okoz a petefészek felületén, amit lokalizálni és csökkenteni kell az ovuláció utáni regeneráció segítésére. Szteroid és nem szteroid faktorok általi sejt-sejt jelzés irányítja a sérülés és javítás folyamatát. A sejtek szteroid dehidrogenáz és reduktáz enzimeket termelnek, amelyek átalakítják és alkalmassá teszik a petefészek felületéhez érkező szteroidokat a receptorokhoz való kötődésre és aktiválják a jelátviteli mechanizmusokat. A 11 $\beta$ -HSD1 növeli a kortizol helyi hozzáférhetőségét a glükokortikoid receptorokhoz és aktiválja a gyulladás ellenes hatást.

A felületi hámsejt kultúrák interleukin-1 jelenlétében fokozzák a 11 $\beta$ -HSD1 kibocsátást, és ezáltal a kortizon-kortizol átalakulást in vitro körülmények között. A kortizol szisztémás gyulladásgátló védelemmel rendelkezik azáltal, hogy kötődik a glükokortikoid



receptorokhoz és inaktíválja a gyulladási jelátviteli utakat a gyulladt szövetekben (Rae és Hillier, 2005).

A helyileg emelkedett, gyulladást gátló kortizol a gyulladási szöveti károsodás minimalizálására szolgálhat és elősegíti a petefészek felületének gyors gyógyulását. Úgy gondolják, hogy az emberi petefészek a kortizol inaktivációja révén védett a stressz okozta fokozott glükokortikoid szinttel szemben. A mellékvese túlzott mértékű glükokortikoid termelése petefészek működési zavarral áll összefüggésben (Hillier és Tetsuka, 1998).

#### *2.1.6. Szerepe a petefészek elváltozásai esetén*

A csökkent  $11\beta$ -HSD1 expresszió károsodást okoz a kortizol metabolizmusában. Ilyenkor a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely kompenzációként aktiválódik. Ez tehető felelőssé a mellékvese túlzott androgén termeléséért a policisztás petefészek szindrómában (PCOS) szenvedő betegnél (Gambineri és mtsai, 2011). Beszámoltak arról, hogy ezeknél a betegeknél csökken a vizelet kortizol: kortizon aránya, ami a  $11\beta$ -HSD2 aktivitás fokozódását vagy a  $11\beta$ -HSD1 11-ketoszteroid reduktáz aktivitás csökkenését jelezheti (Thurston és mtsai, 2003b). Későbbi vizsgálatokban kimutatták azonban, hogy a  $11\beta$ -HSD1 változásai nem függenek össze a PCOS előfordulásával (Gambineri és mtsai, 2011).

A szervezet megváltozott kortizol koncentrációja káros ACTH és LH szekréciónak és cisztás tüszők fejlődéséhez vezet. A fokozott hormontermelés főként a  $11\beta$ -HSD1 aktivitás csökkenésének, kisebb részben a  $11\beta$ -HSD2 aktivitás fokozódásának köszönhető. Cisztás petefészek betegségekben a csökkent LH csúcs frekvencia az érett tüszők ösztadiol termelésének fenntartásával jár. A tüsző ennek hatására nem ovulál, folytatja növekedését és follikuláris cisztává alakul. A spontán petefészek ciszták kialakulását a háziállatokban számos tényező befolyásolja úgy, mint az évszak, tejtermelés, táplálkozás, puerperális stressz. A cisztás tüszőkhöz gyakran társul a mellékvese fokozott androgén termelése. Úgy gondolják, hogy ez a túlzott mértékű ACTH szekréció eredménye, ami a csökkent perifériás kortizol aktiváció következtében csökkent negatív visszacsatolás miatt áll elő.

A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a hirsutizmusban szenvedő nők cisztás petefészeki összefüggésben állnak a  $11\beta$ -HSD1 csökkent kapacitásával annak ellenére, hogy az enzim kódoló gén változatlan ezekben a betegeknél. Tehenek és sertések petefészekét vizsgálva megállapították, hogy mindkét fajban a  $11\beta$ -HSD1 stimulátor vegyülete a

tüszőfolyadékban jelentősen kevesebb a spontán petefészek cisztákban, mint a nagy antrális tüszőkben. Emellett az enzim hidrofób inhibitora nagyobb mennyiségben van jelen a cisztákban az antrális tüszőkben megfigyelthez képest. A tehenek és sertések petefészek cisztáiból származó tüszőfolyadék tehát egyértelműen gátolja a kortizol oxidációját. Az antrális tüszőkből származó folyadéknak ezzel szemben nincs ilyen nettó hatása annak ellenére, hogy szintén tartalmaz az enzimet stimuláló és gátló anyagokat (Thurston és mtsai, 2003b). Hogyha ez a megfigyelés tükrözi a  $11\beta$ -HSD vérben keringő modulátorait is, akkor ez részben megmagyarázhatja a policisztás petefészek és a látszólagos kortizon reduktáz hiány (ACRD) közötti összefüggést hiperandrogén anovulációs nőkben. ACRD-ben szenvedő betegeknel nem mutattak még ki mutációt a  $11\beta$ -HSD1 génben, ami transzkripció utáni hibát jelez az enzim reduktáz aktivitásában. A legújabb eredmények az ACRD-t a  $11\beta$ -HSD1 aktivitás transzláció utáni gátlásának tulajdonítják cisztás petefészek betegségekben, esetleg a ciszták általi fokozott hidrofób inhibitor szekréció miatt.

Cisztás petefészek betegségek esetén a megemelkedett vérbeli hidrofób inhibitor koncentráció a hipofízis-hypothalamus-mellékvese tengely negatív visszacsatolását is akadályozza. Az ennek következtében fellépő fokozott ACTH termelés viszont hozzájárulhat a mellékvese hiperandrogénizmusának kialakulásához, ami jellemző a cisztás petefészek betegségekre. Még nem bizonyított, hogy a tüsző- és a ciszta folyadékban található inhibitor lokálisan a petefészekben termelődik, de a tény, hogy ACRD-s nők első ágú férfi rokonai normális kortizon reduktáz aktivitást mutatnak, támogatja a nézetet, hogy a legtöbb  $11\beta$ -HSD1 inhibitor olyan szövetben vagy mirigyben termelődik, amely csak nőkben található meg (Michael és mtsai, 2003).

Sertésekben megfigyelték, hogy a  $11\beta$ -HSD1 inhibitor szintje fokozatosan csökken, a granulosa sejtek kortizol inaktivációja fokozódik a tüszőérés során. A spontán petefészek cisztákban ezzel ellentétben nő az intrafollikuláris inhibitor szint és a granulosa sejtek alacsony  $11\beta$ -dehidrogenáz aktivitást mutatnak. Ezek a vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a kis antrális tüszők és a petefészek ciszták az aktív glükokortikoidok viszonylag magas intracelluláris koncentrációjának vannak kitéve, továbbá a kortizol helyi szerepére utalnak a tüszőérésben és a petefészek ciszták kialakulásában, növekedésében, a folyadék kiválasztásban (Sunak és mtsai, 2007).

A petefészek cisztás elváltozása mellett, a  $11\beta$ -HSD enzimnek szerepe lehet a daganatok kialakulásában is. Az ovulációhoz kapcsolódó gyulladás tartós fennmaradása valószínűleg hajlamosít a petefészek daganatos betegségeire. A gyulladást gátló válasz

regulációs zavara lehet az egyik tényezője a rosszindulatú betegségnek, ami a petefészek felületi hámjából indul ki. Ezt a feltevést erősíti meg az a felfedezés, hogy a petefészekrák sejtei kevesebb 11 $\beta$ -HSD1 és több 11 $\beta$ -HSD2 mRNS-t bocsátanak ki, mint az egészséges felületi hámsejtek (Rae és Hillier, 2005).

## 2.2. A 11-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim 1-es típusának expressziója kutya szövetekben

A 11 $\beta$ -HSD1 kifejeződését számos szövetben leírták rágcsálókban és emberekben, kutyákban azonban egyelőre kevés adat áll rendelkezésre.

Kutyák zsírszövetében és zsírsejt kultúráiban vizsgálták a 11 $\beta$ -HSD1 kifejezést real-time PCR segítségével. Sikerült az enzimet kódoló mRNS-t minden nagyobb zsírraktárban, továbbá a májban, lépben és vesében is kimutatni. Megállapították, hogy legkisebb mennyiségben a vese és a máj körüli, legnagyobb mennyiségben pedig a bőr alatti, gonadális zsírdépőkben és a csepleszben található meg a 11 $\beta$ -HSD1 mRNS. Szukákban jelentősebb volt az enzim kifejezése a csepleszben, mint kanokban. Emberek csepleszből származó zsírsejtjeiben magasabb enzim aktivitást mértek, mint a bőr alatti zsírszövet sejtjeiben, kutyákban azonban nem volt megfigyelhető ilyen különbség. A zsírsejtekben a 11 $\beta$ -HSD1 gén kifejeződése végig számottevő a sejtek differenciálódása során, azonban általában a legnagyobb mennyiségben a preadipocytákban figyelhető meg és csökken a sejtek érése során. Megfigyelték, hogy kutyák bőr alatti zsírsejtjeiben a lipopoliszacharidok, a tumor nekrozis faktor és a dexamethasonnal vagy a peroxiszóma proliferátor által aktivált receptor agonista roziglitazone-nal való kezelés stimulálja az enzim génjének expresszióját. Ez utóbbi vegyület emberek zsírsejtjeire nem volt hatással, rágcsálókban csökkentette a 11 $\beta$ -HSD1 expressziót a hasonló vizsgálatokban. Továbbá a humán adatokkal ellentétben az interleukin-6 viszont nem hat a kutyák zsírsejtjeinek 11 $\beta$ -HSD1 termelésére. Egyelőre nem tisztázott még, hogy a fajta, kor és elhízás milyen mértékben befolyásolja a kutyák zsírsejtjeinek 11 $\beta$ -HSD1 termelését (Ryan és mtsai, 2011).

Egy másik tanulmányban a Cushing kórban szenvedő kutyák kortikotróp adenomáinak génextpresszióját vizsgálták. Megállapították, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 mRNS kibocsátása jelentősen csökken a kutyák adenoma sejtjeiben az egészséges kortikotróp sejtekhez képest. Ezzel szemben az enzim 2-es típusának mennyisége nő. Hasonló eredményre jutottak egerek, illetve

emberek kortikotróp daganatait vizsgálva. A kisebb  $11\beta$ -HSD1 és nagyobb  $11\beta$ -HSD2 termelés magyarázhatja részben a glükokortikoidok negatív visszacsatolásával szembeni rezisztenciát, továbbá komoly szerepe lehet az adenomák növekedésében Cushing-kóros kutyáknál (Teshima és mtsai, 2009).

## 2.3. A petefészek szövettana

### 2.3.1. A petefészek szövettani felépítése

A petefészek a hasüregben, a vese mögött, az ágyéksigolyák alatt helyeződő, ovális alakú, tömör szerkezetű páros cytogen szerv, amely felépítését a faj, kor, ivari ciklus befolyásolja. Háziállatainkban a ló kivételével egy külső kortikális és egy belső medulláris régióból áll (Fehér, 2000.; Dellmann, 1993.).

Felületét egyrétegű köbhámsejt réteg borítja (epithelium superficiale). Közvetlenül a felületi hám alatt egy rostokban gazdag, érszegény, vastag kötőszöveti réteg helyeződik, amelyet tunica albugineának neveznek.

A velőállomány (zona vasculosa) laza rostos kötőszövetből és simaizom elemekből épül fel, idegeket, vér- és nyirokereket tartalmaz nagy számban. Ezen kívül a petefészek hilusánál található a szabálytalan csatornák hálózatából felépülő, alaphártyával körülvett, köbhámsejtekkel vagy oszlopos sejtekkel bélelt rete ovarii.

A kéregállomány (zona parenchymatosa) laza kötőszövetében találhatóak a fibrocytaszerű, nagy regenerációs képességű, fagocitáló stroma sejtek, amelyek a sárgatestben hormontermelő, epitheloid sejtekké alakulnak, és progeszteront, ösztrogént, esetenként oxytocint termelnek.

A kutya petefészkében kiemelkedő jelentősége van az ún. kortikális tubulusoknak. Ezek a felületi hámmal összefüggő, köbhámsejtekkel bélelt szűk csatornácskák, amelyek közvetlenül a tunica albuginea alatt helyezkednek el. Ivarérett állatokban a petesejt az ovulációig az első meiotikus osztódás késői profázisának nyugalmi állapotában található folliculus sejtekkel, alaphártyával körülvéve. A különböző nagyságú, fejlődési stádiumú tüszők (promordiális, primer, secunder, terciar, Graaf) és a sárgatestek a petefészek kéregállományában helyezkednek el (Liebich, 1990., Dellmann 1993.).

### 2.3.2. A petefészek tüszőinek szövettana

#### Primordiális tüszők

A primordiális tüszők, a női ivarsejtek legkorábban felismerhető alakjai a születés utáni harmadik héttől láthatóak a petefészek kéregben. A körülbelül 40µm átmérőjű tüszők primer petesejtből és az azt egy rétegben körülvevő, alaphártyán nyugvó, lapos folliculáris sejtekből állnak. Születés előtt a petefészek kéreg belső hámsejt tömegeinek mitotikus proliferációjával keletkeznek, de egyes fajokban (például a kutyában) születés után is kialakulhatnak (Fayrer-Hosken és mtsai, 2000.; Dellmann, 1993.).

#### Elsődleges tüszők

A valamivel nagyobb primer tüszőkben egyrétegű köb- majd hengerhám sejtréteg veszi körül a petesejtet. A primer petesejtek első meiotikus osztódása születés előtt indul meg, de az ovuláció időpontjáig nem fejeződik be a profázis, felfüggesztett állapotban marad a pubertás utániig (Dellmann, 1993.).

#### Másodlagos tüszők

A primer tüszők folliculáris sejtjeinek osztódása és a petesejt jelentős növekedése révén kialakulnak a szekunder tüszők. Bennük már többretegű, ún. granulosa sejtekből álló hám veszi körül a mintegy 80 µm átmérőjű petesejtet (Liebich, 1990.). A petesejt organelumainak (mitokondriumainak, endoplazmatikus retikulumának, Golgi-testének) granuláltsága fokozódik, ezen kívül a kutyák, macskák, sertések petesejtjeiben nagy mennyiségű lipid anyag jelenik meg a tüszőfejlődés ezen stádiumában (Fayrer-Hosken és mtsai, 2000.).

A másodlagos tüszőkre jellemző a 3-5µm vastag glycoprotein réteg kifejlődése a petesejt plazma membránja körül, amelyet zona pellucidának nevezünk (Dellmann, 1993.). Ezen a rétegen keresztül desmosomával, majd később nexus típusú sejtkölcsönhatással kapcsolódnak a folliculáris sejtek a petesejthez, amely a megfelelő anyagcsere ellátást biztosítja. A zona pellucida szerepe sokrétű: csak fajspecifikus spermiumok tudják ezt a réteget penetrálni, megakadályozza, hogy megtermékenyítéskor több spermium is bejusson (vagyis a polyspermiát), gátolja a petevezetőben történő, korai beágyazódást, szabályozza a tápanyagok felvételét (Liebich, 1990.).

### Harmadlagos tüszők

A vesicularis vagy Graaf-tüszőknek is nevezett, kutyában akár 0,3 mm-es terciér tüszőkben alaphártyával határolt többrétegű hám veszi körül a petesejtet (Fayrer-Hosken és mtsai, 2000.; Dellmann, 1993.; Liebich, 1990.). A tüsző fejlődése során kis folyadékkal telt rések jönnek létre a folliculus sejtek között, amelyek egyesülnek és kialakítják a hialuronsavban és fehérjében gazdag, tüszőfolyadékkal kitöltött, harmadlagos tüszőkre jellemző antrumot. Az antrum növekedésével a petesejt excentrikus helyzetbe kerül a folliculus sejtek halmazából alkotott cumulus oophoruson (Fayrer-Hosken és mtsai, 2000.; Liebich, 1990.).

A tüsző falát alkotó folliculus sejteket helyzetük alapján basalis, intermedialis illetve granulosa sejteknek nevezzük. Az alaphártyával összefüggő, külső basalis sejtréteg endoplazmatikus retikulumaiban androgénekből ösztrogén termelődik. Ezen kívül mindhárom sejttípus részt vesz a tüszőfolyadék képzésében és az anyagcsere folyamatokban (Liebich, 1990.). Érett terciér tüszőkben granulosa sejtek alkotják a petesejtet körülvevő zona pellucida körül az ún. corona radiatát, amelynek feladata a petesejt táplálása (Fayrer-Hosken és mtsai, 2000.; Dellmann, 1993.). A granulosa sejtek rétege körül egy belső, vér- és nyirokerekkel gazdagon átszőtt theca internának és egy külső, támogató szerepet betöltő, vékony kötőszöveti theca externának nevezett sejtréteg alakul ki.

A fejlődés ezen stádiumában a primer petesejt befejezi első meiotikus osztódását és secunder petesejtté alakul. Háziállatainkban általában az ovuláció előtt nem sokkal fejeződik be az első meiotikus osztódás, kivéve kutyákban és lovakban, ahol az ovuláció után. A második meiotikus osztódás közvetlenül az első után indul meg, de megakad a metafázisban, hacsak meg nem termékenyül. Mind a granulosa, mind a theca sejtek érzékennyé válnak a gonadotrop hormonok iránt. Az előbbi sejteken FSH (folliculus stimuláló hormon), az utóbbiakon LH (luteinizáló hormon) receptorok fejlődnek. A theca interna sejteken az LH kötődés androgének (tesztoszteron, androsztenedion) és kis mennyiségű ösztradiol szintézisét stimulálja, míg a granulosa sejteken FSH hatására az aromatáz enzim rendszer aktiválódik, amely a keletkezett androgéneket ösztrogénekké (17 $\beta$ -ösztradiol, ösztron) alakítja. A tüszőfolyadék magas ösztrogén szintje kedvező környezetet biztosít a tüsző megfelelőéréséhez. Az ovulációt megelőző LH hullám gátolja a granulosa sejtek aromatáz aktivitását, és ezáltal az ösztrogén szintézist.

A teljesen érett tüszők kidomborodnak a petefészek felületén. A tüsző körüli vér- és nyirokér hálózatokban uralkodó nyomás emelkedik, a permeabilitásuk fokozódik a

proösztusz és az ösztusz alatt. Ennek hatására több tüszőfolyadék termelődik, a tüsző megduzzad, fala elvékonyodik, majd megreped. Az így kilökődő petesejt az öt körülvevő corona radiatával együtt a peritoneális üregbe, majd a petevezető infundibulumába jut.

A petesejt kevesebb, mint egy napig termékeny. Ha nem termékenyül meg, degenerálódik és felszívódik (Dellmann, 1993.).

### *2.3.3. A sárgatest szövettana*

Az alaphártya feltöredezése után közvetlenül kapillárisok térnek a tüsző falába. Ovulációkor a tüsző lumenébe vér, tüsző folyadék szűrődik és kialakul a corpus haemorrhagicum. Ez a nagyfokú makrofág aktivitásnak köszönhetően néhány napon belül szervül, és kialakul a corpus luteum (Liebich, 1990.)

Ovulációt követően a granulosa sejtek megnagyobbodnak, vascularizálódnak, luteinizálódnak és az ún. nagy lutein sejtekké, a theca sejtek pedig kis lutein sejtekké válnak. A luteinizáció során hypertrophia, hyperplasia figyelhető meg mindkét sejttypusban, ezen kívül szukákban, kancákban és tehenekben sárga pigment (lutein) jelenik meg a sejtekben. A két luteális sejttypus keverten fordul elő a sárgatestben, elkülönítésük nehézkes (Dellmann, 1993.).

A késői metösztusz és a diösztusz alatt progeszteront, ezen kívül ösztrogént és esetenként oxytocint, relaxint termelnek. A méhnyálkahártya által termelt prosztaglandin (PGF $2\alpha$ ) hatására indul meg a corpus luteum sorvadása. A regresszió első jelei a késői diösztuszban válnak láthatóvá: az érfalak hypertrophiájával, sclerosisával egyre szűkülnek, majd elzárulnak a vérerek, a lipid vakuolumok összeolvadnak, vöröses színűvé válnak, majd fibrotizálódnak. Eközben a lutein sejteket a makrofágok folyamatosan bontják, az interstitialis kötőszövet szaporodik. A luteális regresszió után megmaradó kötőszöveti heget corpus albicansnak nevezik. (Dellmann, 1993.; Liebich, 1990.)

## 2.4. A 11-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim kimutatási lehetőségei

Különböző specifikus enzim aktivitást alkalmazó technikák segítségével vizsgálható a 11 $\beta$ -HSD1 szövet specifikus kibocsátása. Ilyen kimutatási módszerek például az immunhisztokémia, az in situ hibridizáció és a Western blot (Tomlinson és Stewart, 2001).

### 2.4.1. Immunhisztokémia

Az elmúlt időszakban az immunhisztokémiai kimutatás a hisztopatológiai vizsgálatok fontos részévé vált emberek és állatok esetében egyaránt. Az antigén-antitest reakción alapuló immunhisztokémiai vizsgálatok során egyre inkább specifikus markereket alkalmaznak, amelyek specifikus fehérjékkel reagálnak, azonban különböző ellenanyagok kombinált keverékét is használhatják. A petefészek immunhisztokémiai vizsgálatait két nagy csoportra lehet osztani: a szerkezeti jellemzők megfigyeléséhez intermedier filamentum, míg a funkcionális tulajdonságok megállapításához hormon fehérjéket vagy hormon receptorokat felismerő antitesteket használnak. Az intermedier filamentumok citoskeletális fehérjék, amelyek hozzájárulnak a sejtek szerkezeti integritásához, részt vesznek a sejtek közötti kapcsolatban, transzportban, interakciókban, sejtek differenciálódásában és proliferációjában (Akihara és mtsai, 2007).

Immunhisztokémiai vizsgálattal strukturális vagy funkcionális fehérjéket, glükoproteineket, poliszacharidokat vagy lipideket lehet az ellenük termeltetett antitestek segítségével kimutatni. A módszert gyorsfagyasztott vagy pufferolt 4%-os formaldehid oldatban rögzített, paraffinba vagy műgyantába ágyazott preparátumon lehet alkalmazni.

Kezdeti lépésként többször váltott xilol segítségével kioldjuk a paraffint a mintából, ugyanis az akadályozza a megfelelő antigén-antitest reakciót. Ezt követően leszálló alkohol sorozatban, majd desztillált vízben tartjuk meghatározott ideig a metszeteket. A formaldehiddel fixált mintákban a fehérjék természetes térbeli szerkezete a kialakuló keresztkötések miatt irreverzibilisen megváltozhat. Ennek következtében az epitópok hozzáférhetetlenné válhatnak az ellenanyagok számára.

A következő lépés az antigén feltárása és a nem specifikus fehérjekötő helyek blokkolása. Az aspecifikus antitest-kötőhelyekhez ellenanyagok kötődhetnek, ami



nagymértékben ronthatja a reakció minőségét. Ennek kiküszöbölésére 10-20%-os normál, „nonimmun” szérumokkal, albuminokkal telítik ezeket a kötőhelyeket.

Szükség lehet az endogén peroxidáz aktivitás blokkolására is, amit 0,5-1-5% hidrogén-peroxidot tartalmazó metanollal vagy 3%-os hidrogén-peroxiddal történő kezeléssel érnek el. Ezzel az eljárással szüntethető meg a vörösvérsejtek hemoglobin tartalmának pszeudoperoxidáz aktivitása.

A primer antitesteket a gyártó által megadott módon hígítják a felhasználás során. Ehhez pufferolt fiziológias sóoldatot vagy specifikusabb 10-20%-os „non-immun” szérumos pufferoldatokat alkalmaznak. A hígítást követően 40-60 percig inkubálják a mintát a primer antitesttel.

Az antigénhez kötött antitesteket direkt vagy indirekt módon mutathatjuk ki. Az előbbi esetén enzimmel vagy fluorokrómmal közvetlenül konjugált antitestet használnak, míg az indirekt eljárásnál a primer antitest ellen termeltetett jelölt, jelöletlen vagy biotinnal konjugált antitestet. Az indirekt eljárás befejezhető vagy tovább vihető még több lépésben (szendvics technika).

Jelzőrendszerként leggyakrabban a peroxidáz-antiperoxidáz komplexet használják, de más enzimek is alkalmasak. A reakció alapja az, hogy a peroxidáz bontja a hidrogén-peroxidot és a felszabaduló naszcens oxigén, a hozzáadott kromogénnel reakcióba lépve oldhatatlan színes csapadékot képez. Kromogénként a leggyakrabban a 3'3-diaminobenzidint (DAB) használatos, ami barna csapadékot képez.

Az eljárás utolsó lépése a kontrasztfestés vagy magfestés. Fontos, hogy úgy válasszuk meg a reagenst, hogy az egyértelműen eltérjen az enzimreakció színétől. Például a peroxidáz alapú rendszereknél, illetve a piros színreakciót adó jelölések esetén általában haematoxilint alkalmaznak (Krutsay, 1999; Merz és mtsai. 1993).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. Mintagyűjtés

A mintavétel a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika Kisállatklinikáján történt. Összesen 17 ovariectomia vagy ovariohysterectomia során eltávolított egészséges vagy elváltozott petefészket vizsgáltunk. A minták különböző korú és fajtájú kutyákból származtak, az ivari ciklus különböző szakában kerültek eltávolításra.

#### 3.2. A minta beágyazásának lépései

- A mintákat 8%-os pufferolt formaldehid-oldatban fixáltuk 24 órán keresztül.
- Majd a rögzített mintákból egyenletes, 4-6 mm vastagságú szervminta-szeleteket készülték.
- A rögzítő oldatot minimum 2 órán keresztül állandóan áramló csapvízzel távolították el.
- A szervminta-szeleteket beágyazó automatába helyezték, amelyben ún. felszálló alkohol sorral kezelték a következőképpen: először 70%-os alkoholban 2 óráig, majd 80%-os alkoholban 1 óráig, 90%-os alkoholban szintén 1 óráig, ezt követően két alkalommal 96%-os alkoholban 1-1 óráig, végül pedig abszolút alkoholban ugyancsak kétszer 1-1 óráig.
- Ezután három tagból álló xilol-sorral készítették elő a mintát a paraffin beágyazásra. Az első oldattal 30 percig, a második és harmadik oldattal 45-45 percig tartott a kezelés.
- Ezt követően a mintákat 58 °C-nál nem magasabb olvadáspontú paraffin sorozaton vitték keresztül. Az első három alkalommal 30-30 percig, az utolsónál 2 óráig kezelték.
- A kiöntés 56 °C-ra beállított Blokk-kiöntő automatán (Histocenter 2) történt.
- A teljes kihűlésig hűtőlapon tárolták.
- A blokkokból 4 µm vastagságú metszeteket készítettek, amelyeket 45 °C-os desztillált vízbe helyeztek.
- A metszeteket ezt követően egy éjszakára 56 °C-os termosztátba helyezték.
- Végül fedéllel zárható metszetfestő üvegcád segítségével eltávolították a paraffint, ami a következő lépésekből állt: xilollal kezelték 10-10 percig

összesen két alkalommal, majd abszolút alkohollal, 96%-os alkohollal, 70%-os alkohollal 5-5 percig, végül desztillált vízzel öblítették szintén 5 percig.

### 3.3. Az immunhisztokémiai vizsgálat menete

- A vizsgálandó mintából és egy pozitív kontroll mintából 4 µm vastagságú paraffin-metszetet készítettek.
- Egy éjszakán keresztül 56 °C-os termosztátban szárították.
- A metszetet deparaffinálták.
- Majd citrátos oldattal (9 ml 0,1M citromsav és 41 ml 0,1M nátrium-citrát desztillált vízzel 500 ml-re felöntve) kezelték 30 percig mikrohullámú sütőben.
- Háromszor PBS oldattal (80g nátrium-klorid, 29g dinátrium-hidrogénfoszfát 12 H<sub>2</sub>O, 2g kálium-klorid, 2g kálium-dihidrogénfoszfát, 1000ml desztillált víz) öblítették.
- Ezután 3 %-os hidrogén-peroxid oldattal kezelték 10 percig szobahőmérsékleten.
- Majd ismét PBS oldattal öblítették.
- Ezt követően a metszeteket Sequenza Immunostaining Centerbe helyezték, és 2%-os tejporral blokkolták 20 percig szobahőmérsékleten.
- Majd egy éjszakán át 11β-HSD1 ellenanyaggal (Abcam, rabbit polyclonal) inkubálták 4 °C-on 1:50 hígításban.
- PBS oldattal öblítették.
- Ezután kötő ellenanyaggal (nyúl EnVision) kezelték 30 percig szobahőmérsékleten.
- Ismét PBS-sel öblítették.
- Majd AEC (amino-etil carbasol) kromogén oldattal kezelték 10 percig szobahőmérsékleten.
- Ezután kivették a metszeteket a Sequenza Immunostaining Centerből, és csapvízzel, majd desztillált vízzel leöblítették.
- Haematoxilinnal és eozinnal megfestették.
- Csapvízzel öblítették.
- Végül glicerin-zselatinnal (7g zselatin, 42 ml desztillált víz, 50 ml glycerol) fedték.

## 4. EREDMÉNYEK

A 11 $\beta$ -HSD1 ellenanyaggal és AEC kromogénnel jelölt petefészek minták fénymikroszkópos vizsgálata során kapott eredményeket a következő táblázatban foglaltuk össze.

A petefészek tüszői	A petefészek sejtjei	Festődés
Primordiális tüszők	petesejt	++
	follikuláris hámsejtek	+/-
Elsődleges tüszők	petesejt	++
	follikuláris hámsejtek	+/-
Másodlagos tüszők	petesejt	+
	granulosa sejtek	+
Harmadlagos tüszők	petesejt	+
	granulosa sejtek	+
	theca interna sejtek	+/-
	theca externa sejtek	-
Sárgatestek	granulosa lutein sejtek	+++
	theca lutein sejtek	-
Stroma	stroma sejtek	?

**Táblázat:** (-) nincs festődés; (+) gyenge festődés; (++) erős festődés; (+++) nagyon erős festődés; (+/-) nem minden sejtben látható festődés; (?) bizonytalan

Az enzim a 17 mintából 16-ban volt kimutatható. A negatív eredményt mutató minta esetében valószínűsíthetően fixálási hiba történt. Mintáink esetében a szakirodalomnak megfelelő, a citoplazmában megjelenő, inhomogén festődést tekintettük pozitív reakciónak. A vizsgálat során a szakirodalomban is meghatározott, luteinizálódott granulosa sejteket használtuk belső pozitív kontrollként.

A legerősebb festődést a sárgatestek granulosa lutein sejtjeiben figyelhettük meg (1. kép). Petefészek mintáink közül 12-ben láthattunk sárgatesteket, ezek mindegyikében egyértelműen megállapítható volt az enzim jelenléte. Minden granulosa lutein sejt pozitivitást mutatott, azonban eltérő mértékben. A sejtek reakciója között egyértelmű különbséget állapítottunk meg, illetve a sejtek citoplazmájában is inhomogén festődés volt jellemző.

Erősen festődtek a primordiális és a primer tüszők petesejtjei is. Az éretlen petesejtekben erősebb volt a pozitivitás, míg a secunder és tertier tüszők petesejtjei már láthatóan gyengébben mutatták a reakciót. Nagyobb nagyítással vizsgálva a petesejtiek esetében is inhomogenitást állapíthattunk meg a festődésben.

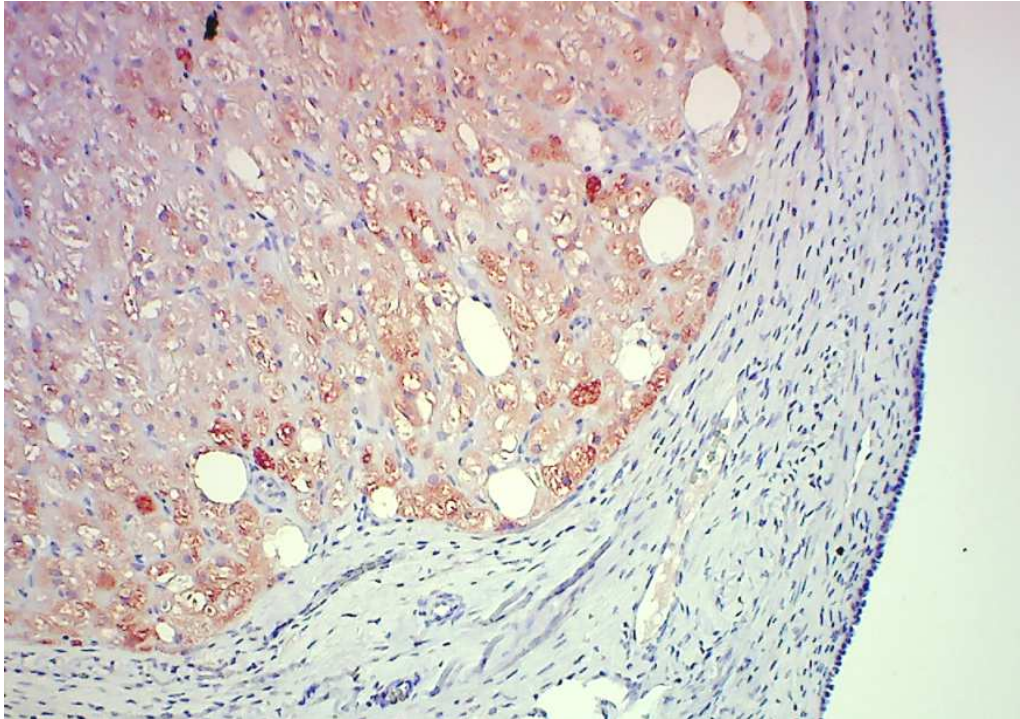
A secunder és a tertier tüszők granulosa sejtjeiben szintén megfigyelhettük az enzim expressziójának jeleit. A másodlagos tüszőkben jobban látszott a sejtek kis nagyítással egységesnek tűnő festődése, mint a harmadlagos tüszők hasonló sejtjeiben. Kevés mintában tudtunk tertier tüszőt megfigyelni, illetve utóbbinál a pozitivitás sokszor nem volt egyértelmű.

Nem volt egységes az eredmény a primordiális és a primer tüszők folliculáris sejtjeinek esetében. Nagy nagyítással vizsgálva a tüszők egy részénél enyhe pozitivitást állapíthattunk meg, azonban több mintánál ez nem látszott.

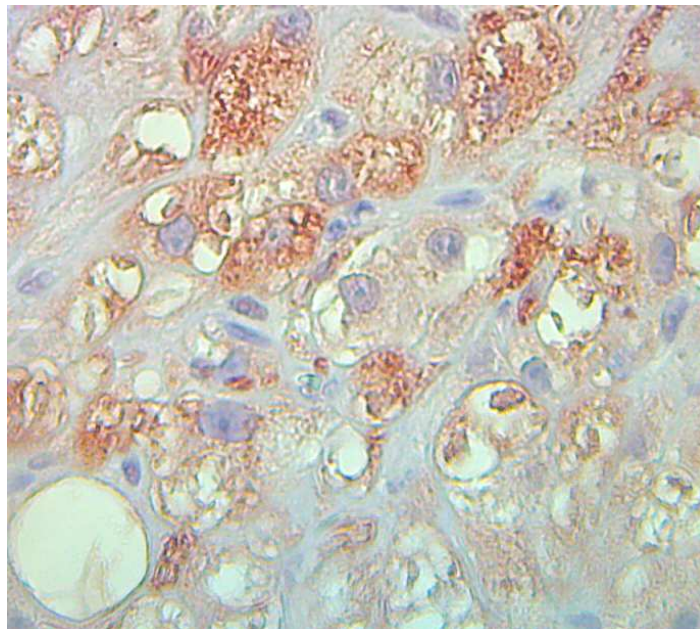
A tertier tüszők theca interna sejtjeit vizsgálva sem jutottunk egyértelmű eredményre. A legtöbb mintában látható volt a sejtek enyhe festődése, azonban akadtak negatív minták is. A harmadlagos tüszők theca externa sejtjei és a sárgatestek theca lutein sejtjei minden esetben egyértelmű negativitást mutattak a reakcióban, egyik mintában sem volt kimutatható a 11 $\beta$ -HSD1 jelenléte ezekben a sejtekben.

A spinocelluláris kötőszövet stroma sejtjei hasonlóképpen bizonytalan eredményt adtak. A legtöbb sejtet negatívnak értékeltük a reakcióban, azonban néhány stroma sejtben enyhe pozitivitást találtunk.

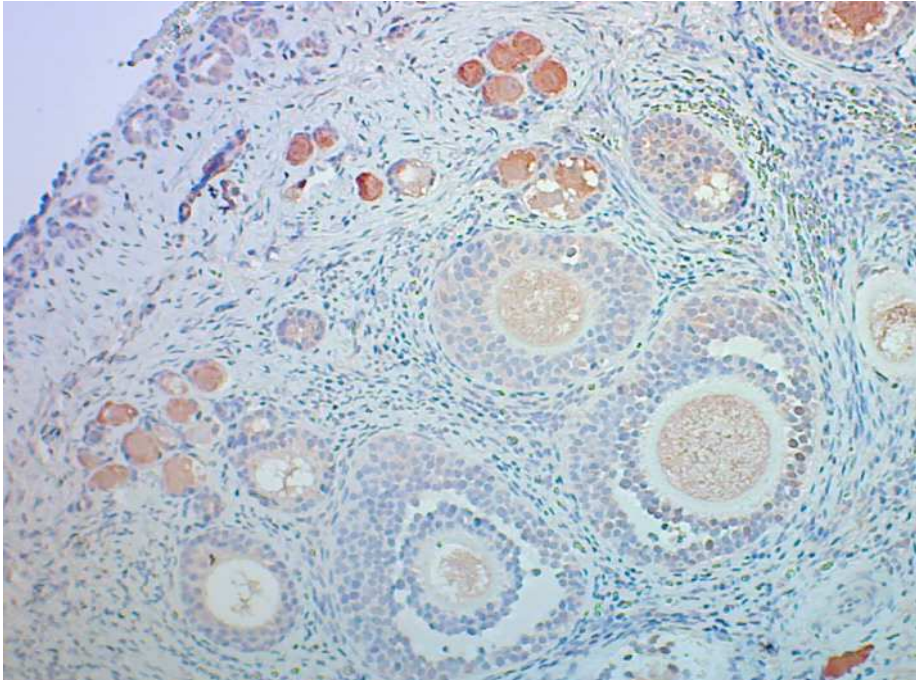
Összességében megállapítottuk, hogy a sárgatest tekinthető pozitív kontrollnak a petefészek adott vizsgálatában, mivel a granulosa lutein sejtekben minden esetben erős festődést láthattunk kis nagyítással. Nagyobb nagyítással vizsgálva a metszeteket azonban megfigyeltük, hogy ezekben a sejtekben sem egységes a festődés. Egyes sejtek erősebben, mások gyengébben festődnek, sőt még sejten belül is inhomogenitás jellemző. Ez a megfigyelés más pozitívan reagáló sejtek alaposabb vizsgálatakor is megállapítható volt. Nagy nagyítással a sárgatestek és a tüszők megfelelő sejtjei sok esetben hasonló mértékben festődtek, noha kisebb nagyítással vizsgálva a pozitivitás nehezen volt eldönthető.



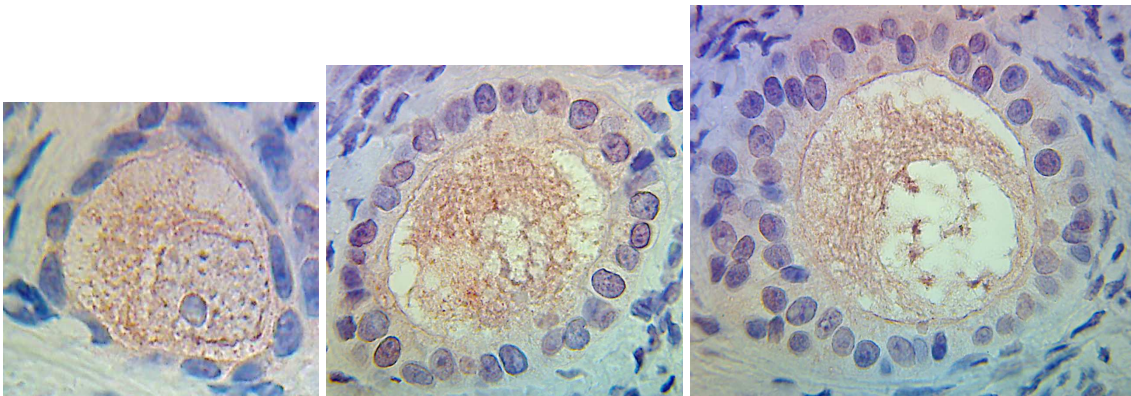
**1. kép:** A sárgatest granulosa lutein sejtjei élénken festődnek



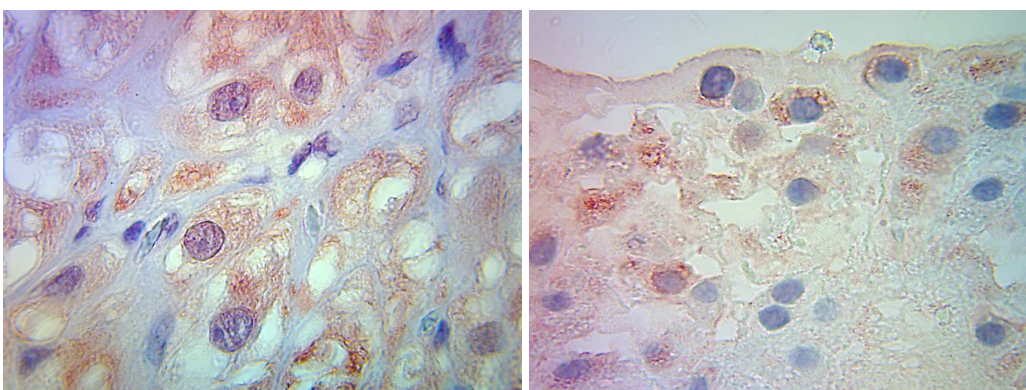
**2. kép:** Nagyobb nagyítással megfigyelhető inhomogén festődés a luteinizálódott granulosa sejtekben



**3. kép:** A follikulusok festődése



**4-6. kép:** A primordiális, primer és secunder tüszők festődése



**7-8. kép:** A sárgatest sejtjeinek (7. kép) és a terciér tüsző falában található granulosa sejtek (8. kép) festődésének összehasonlítása

## 5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során a 11 $\beta$ -HSD1 enzim szöveti expresszióját vizsgáltuk kutyák eltávolított petefészkeiben. Célul tűztük ki, hogy megfigyeljük az esetleges eltéréseket, illetve hasonlóságokat a szakirodalomban leírt más fajokkal összehasonlítva, továbbá hogy megállapítjuk, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 ellenanyag alkalmas-e ebben az állatfajban a petefészek vizsgálatára immunhisztokémiai módszerek alkalmazásakor. Vizsgálataink során az alkalmazott ellenanyag erős immunreaktivitást mutatott.

Az értékeléskor mindvégig szem előtt tartottuk, hogy a vizsgált enzim expressziójának vizsgálata nem jeleníti az enzim aktivitásának ismeretét az egyes sejttípusokban, így ebben a kérdésben továbbra is csak feltételezhetjük a más állatfajokkal való egyezést.

Az enzim 1-es izotípusát számos faj számos szövetében kimutatták már. A petefészekben történő előfordulásáról ember, patkány, szarvasmarha és sertés fajban állnak rendelkezésre adatok a szakirodalomban. Emberekben és patkányokban a sárgatestek granulosa lutein sejtjeiben és a petesejtben figyelték meg legnagyobb mértékben az enzim expresszióját (Ricketts és mtsai, 1998; Gomez Sanches és mtsai, 2009.), mint ahogyan azt tanulmányunk során kutyák esetében is tapasztaltuk. Hasonlóképpen szarvasmarhákban is leírták az enzim jelenlétét a sárgatest sejtjeiben (Thurston és mtsai, 2007; Komiyama és mtsai, 2008; Tetsuka és mtsai, 2003). Ebben az állatfajban azonban jelentős eltéréseket tapasztaltak a humán és patkányokban leírt adatokkal összehasonlítva. Tehenekben az enzim mindkét izotípusa expresszálódik: a 11 $\beta$ -HSD1 az aktív sárgatestben és a granulosa sejtekben, a 11 $\beta$ -HSD2 a sorvadó corpus albicansban. A tüszők granulosa sejtjeiben csak az enzim 1-es izotípusát mutatták ki, a 2-es nem fordult elő. Továbbá nem volt megfigyelhető abszolút átállás az enzim 2-es izotípusának termeléséről az 1-esre az ovuláció során, mint ahogyan azt más állatfajokban megfigyelték (Michael és mtsai, 2003).

Emberekben és patkányokban a preovulációs tüszők granulosa sejtjei 11 $\beta$ -HSD2-t termelnek a szarvasmarhákkal ellentétben (Thurston és mtsai, 2007). Leírták, hogy a humán granulosa sejtekben a luteinizáció során viszont már az enzim 1-es típusának mRNS-e termelődik (Thurston és mtsai, 2003). A változás hátterében feltehetően az LH hatása áll. Kimutatták, hogy azok a granulosa sejtek, amelyeknél nem tapasztaltak LH-csúcsot az ovulációt megelőzően, 11 $\beta$ -HSD2-t kódoló mRNS-t és mineralokortikoid receptorokat



expresszáltak továbbra is, míg az LH csúcsot elért sejtekben megváltozott az enzimtermelés (Michael és mtsai, 2003).

A kutyák esetében megállapítottuk, hogy a sárgatestek granulosa lutein sejtjeiben nagyobb, a tüszők granulosa sejtjeiben valamivel kisebb mennyiségben, de egyértelműen jelen van a 11 $\beta$ -HSD1 enzim a tüszők érésével egyre csökkenő mennyiségben. A 2-es izotípus előfordulását nem vizsgáltuk munkánk során, így annak sejtípusonkénti expressziójának megállapítása további vizsgálatokat igényel.

Mind a tüszők granulosa sejtjeiben, mind pedig a sárgatestek granulosa lutein sejtjeiben az enzim oxidatív aktivitását feltételezzük. A 11 $\beta$ -HSD1 oxidatív formája, illetve az enzim 2-es izotípusa a kortizol inaktivációját katalizálja, ezáltal védelmet biztosít a petefészekben a glükokortikoidok gonadotropin hatást és szteroid bioszintézist gátló hatásával szemben. Az enzim 1-es izotípusának oxidatív funkciója abban az esetben figyelhető meg, ha a NADPH: NADP arány csökken a szteroid bioszintézis vagy a citokróm P450 enzimek működése következtében. Az enzim redukzív működéséhez szükséges kofaktor nagyfokú felhasználása miatt a dehidrogenáz funkció válik dominánssá a szteroid hormonokat termelő sejtekben. Az oxidatív hatás a glükokortikoidok inaktivációját eredményezi, tehát a helyi kortizol koncentráció csökkenéséhez vezet (Thurston és mtsai, 2007).

Ezzel szemben a petesejt és a felületi hámsejt esetében valószínűsíthetően a 11 $\beta$ -HSD1 enzim NADPH-dependens redukáz formája dominál, így az inaktív glükokortikoidok aktivációjában vesz részt.

A petesejt esetében ez az aktiváció az érést, fejlődési potenciált támogatja számos gerinces fajban, köztük az emberben. Ezzel szemben sertéseknél az aktív glükokortikoidok gátló hatásról számoltak be a petesejtek meiotikus fejlődésére nézve (Michael és mtsai, 2003). Kutyák esetében azt találtuk, hogy a petesejtek érése folyamán csökkenő mértékben jellemző a 11 $\beta$ -HSD1 expresszió. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy ebben a fajban is a kortizol fejlődést támogató szerepe érvényesül.

Az enzim a petefészek felületi hámsejtjeiben szintén redukzív aktivitású, így gyulladáscsökkentő hatású aktív glükokortikoidok képződését katalizálja, amivel elősegíti az ovulációt követő gyulladással járó folyamat mérséklését és támogatja a gyors felületi gyógyulást. Ezt a funkciót humán petefészek vizsgálatokban állapították meg (Michael és mtsai, 2003; Rae és Hillier, 2005). Munkánk során kutyák petefészkeinek felületi hámsejtjeit, illetve a stoma sejteket illetően nem állapítottunk meg egyértelmű eredményt. A legtöbb sejtet

negatívnak ítéltünk a reakcióban, de akadtak pozitívan festődő területek is mintáink egy részében.

Hasonlóképpen, a theca interna sejtek esetében sem tudunk vizsgálataink alapján biztos megállapítást tenni. Sok sejtben kimutattuk a 11 $\beta$ -HSD1 jelenlétét, azonban több esetben előfordult, hogy nem tapasztaltunk festődést. Patkányok theca sejtjeiben enyhe, a granulosa sejtekhez viszonyítva lényegesen kisebb mértékű festődést írtak le a szakirodalomban, és mindkét sejt típusban a 11 $\beta$ -HSD2 lényegesen nagyobb mértékű expressziójáról számoltak be (Gomez-Sanchez és mtsai, 2009). Az immunhisztokémiai vizsgálat nehéz értékelhetősége miatt a bizonytalan eredményt adó felületi hámsejtek és theca sejtek bírálata további részletesebb vizsgálatokat igényel.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink egyezést mutattak egy korábban patkány petefészkek mintákon végzett vizsgálat megállapításaival (Gomez-Sanchez és mtsai, 2009). A vizsgált petefészkek az ivari ciklus különböző szakaszaiban kerültek eltávolításra, mivel azonban nem állt rendelkezésünkre minden szakaszból elegendő minta, továbbá a szerv-minták korlátozott száma miatt a 11 $\beta$ -HSD1 expresszió ciklusfüggő változását illetően nem tudtunk megállapítást tenni. Az összefüggés felderítéséhez további kutatás szükséges.

Az enzim jelenlétének igazolása kutya fajban, kiemeli az enzim szisztémás folyamatokban, anyagcsere zavarakban betöltött lehetséges szerepét ebben a fajban is és felhívja a figyelmet az enzim több szövetet érintő vizsgálatának fontosságára. Tekintve, hogy a metabolikus folyamatok vizsgálata esetében a kutya mint modellállat jelentősége egyre nő napjainkban, mindamellett hogy ki kell emelnünk, hogy az enzim komplex folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatakor nem nélkülözhető az expresszió kvantitatív meghatározása, valamint az enzim aktivitásának vizsgálata, mindenképp elmondhatjuk, hogy az általunk végzett vizsgálat és a vizsgálati módszerek további, ilyen típusú bővítése fontos tudományos előrelépésnek minősíthető.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatásunk célja a 11 $\beta$ -HSD1 enzim szöveti expressziójának vizsgálata volt kutyák műtétilag eltávolított petefészkeiben. Az ovariectomia vagy ovariohysterectomia során eltávolított egészséges vagy kórosan elváltozott petefészkek a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika beteganyagából származtak. A mintákból 8%-os pufferolt formaldehid oldat segítségével történt fixálást követően gépi szövet előkészítés után paraffinos blokkok, majd haematoxilinnal és eosinnal festett metszetek készültek. Ezt követően az immunhisztokémiai vizsgálat során 11 $\beta$ -HSD1 ellenanyagot és AEC kromogént alkalmaztunk. Az elkészült mintákat fénymikroszkóp segítségével értékeltük ki.

A 11 $\beta$ -HSD1 ellenanyag erős immunreaktivitást mutatott a vizsgálatban. A kutyák sárgatestjeit alkotó a granulosa lutein sejtek minden esetben egyértelműen pozitív reakciót adtak, azonban a sejtek festődése nem volt azonos mértékű. Sejten belül is inhomogenitást tapasztaltunk a reakcióban. A petefészkek tüszőinek sejtjeinél fejlődési stádiumuknak megfelelően változott a pozitivitás. A petesejt esetében csökkenő festődést figyelhattunk meg az érés során, a granulosa és a theca interna sejtek enyhe pozitivitást mutattak. A follikuláris fázis alatt jellemző alacsonyabb 11 $\beta$ -HSD expresszió háttérben feltehetően nagyrészt a magas ösztrogén termelés gátló hatása áll, de a progeszteron szint és a tüszőfolyadék összetétele is befolyásolhatja azt. A felületi epithel sejtek, stroma sejtek mintáink nagy részében nem festődtek, azonban határozott negativitást sem tudtunk megállapítani.

Legtöbb megfigyelésünk egyezik a humán illetve patkány petefészkek esetében megállapított adatokkal, azonban a reakció nehéz értékelhetősége miatt a tüszők theca sejtjei és a stroma sejtek esetében nem jutottunk egyértelmű eredményre.

Összességében megállapítottuk, hogy a 11 $\beta$ -HSD1 ellenanyag kutyákban is alkalmas az egészséges és az elváltozott petefészkek részletes vizsgálatára. Az ivari ciklus és az enzim expresszió összefüggésének értékeléséhez azonban további vizsgálatokra van szükség.

## 7. SUMMARY

The aim of our research was to investigate the tissue expression of the 11 $\beta$ -HSD1 enzyme in dogs' ovaries that have been surgically removed. The healthy or the pathologically altered ovaries that was removed during ovariectomy or ovariohysterectomy were delivered of Szent Istvan University Faculty of Veterinary Science Department and Clinic of Obstetrics and Reproduction. The samples were firstly fixed with 8% buffered formaldehyde, followed by the tissue preparation and then paraffin blocks were created. After that sections were stained with haematoxylin and eosin. Subsequently during the immunohistochemical research 11 $\beta$ -HSD1 antibody and AEC chromogen were applied. The prepared samples were evaluated with using light microscopy.

The 11 $\beta$ -HSD1 antibody showed strong immunoreactivity in the study. The granulosa lutein cells in the corpus luteum showed a clear positive reaction in all cases, but the cells did not stained at the same level. In the reaction we also observed inhomogeneity within the cells. The level of positivity of the follicular cells changed according to cells' development. During the maturity we observed decreasing staining in the oocyte, the granulosa and the theca interna cells showed a slight positivity. The lower 11 $\beta$ -HSD expression of the follicular phase is presumably mainly caused by an inhibitory effect of a high oestrogen production, but this is also influenced by level of progesteron and the content of follicular fluid. The most of the surface epithelial cells and stromal cells of our samples did not get stained, however we could not determine clear negativity.

This observation is similar to the data described of humans and rats, but due to the difficulty of evaluating the reactions we did not get a clear result in the cases of follicular theca cells and stromal cells.

In total we concluded, that the 11 $\beta$ -HSD1 antibody can be applied for dogs as well to both healthy and altered ovaries as detailed examination. The evaluation of the relation between the oestrous cycle and the enzyme expression however needs further investigations.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Müller Lindának a felajánlott témáért, a mintagyűjtésben és szakdolgozatom megírásában nyújtott segítségével, sok hasznos tanácsáért.

Köszönöm a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszékének, hogy lehetővé tette a kutatást.

Köszönettel tartozom a Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszéknek, különösképpen Pop Renátának és Mészáros Ágnesnek a metszetek elkészítéséért és az immunhisztokémiai vizsgálatokban, illetve dr. Perge Edinának a kiértékelésben nyújtott segítségével.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. AKIHARA, Y., SHIMOYAMA, Y., KAWASAKO, K., KOMINE, M., HIRAYAMA, K., TERASAWA, A., OHMACHI, T., MATSUDA, K., OKAMOTO, M. and TANIYAMA, H.: Histological and Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovary. *Reproduction in Domestic Animals*, 2007. 42. p. 495-501.
2. DELLMANN, H.-D.: Textbook of Veterinary Histology. 4th Edition, 1993. p. 233-242.
3. EVAGELATOU, M., PETERSON, S. L., COOKE, B. A.: Leukocytes modulate 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) activity in human granulosa-lutein cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997. 133. p. 81-88.
4. FAYRER-HOSKEN, R. A., DOOKWAH, H. D., BRANDON, C. I.: Immunocontrol in dogs. *Animal Reproduction Science*, 2000. 60-61. p. 365-373.
5. FEHÉR GY.: A háziállatok funkcionális anatómiája. Budapest: Mezőgazda Kiadó., 2000. p. 429-444.
6. FELDMAN K., LIKÓ I., NAGY ZS., SZAPPANOS Á., GROLMUSZ V. K., TÓTH M., RÁCZ K., PATÓCS A.: A 11- $\beta$ -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben. *Orvosi Hetilap*, 2013. 154. p. 283-293.
7. GAMBINERI, A., TOMASSONI, F., MUNARINI, A., STIMSON, R. H., MIONI, R., PAGOTTO, U., CHAPMAN, K. E., ANDREW, R., MANTOVANI, V., PASQUALI, R. and WALKER, B. R.: A combination of polymorphisms in HSD11B1 associates with in vivo 11 $\beta$ -HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 2011. 165. p. 283-292.
8. GOMEZ-SANCHEZ, E. P., GOMEZ-SANCHEZ, M. T., RODRIGUEZ, A. F., ROMERO, D. G., WARDEN, M. P., PLONCZYNSKI, M. W. and GOMEZ-SANCHEZ, C. E.: Immunohistochemical Demonstration of the Mineralocorticoid Receptor, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 and -2, and Hexose-6-phosphate Dehydrogenase in Rat Ovary. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2009. vol. 57. no.7. p. 633-641.

9. HILLIER, S. G. and TETSUKA, M.: An anti-inflammatory role for glucocorticoids in the ovaries?. *Journal of Reproductive Immunology*, 1998. 39. p. 21-27.
10. HONG-YU ZHOU, GUO-XIN HU, QING-QUAN LIAN, DAVID MORRIS, RENSHAN GE: The metabolism of steroids, toxins and drugs by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Toxicology*, 2012. 292. p. 1-12.
11. KOMIYAMA, J., NISHIMURA, R., LEE HWA-YONG, SAKUMOTO, R., TETSUKA, M., ACOSTA, T. J., SKARZYNSKI, D. J. and OKUDA, K.: Cortisol Is a Suppressor of Apoptosis in Bovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, 2008. 78. p. 888-895.
12. KROZOWSKI, Z., LI, K. X. Z., KOYAMA, K., SMITH, R. E., OBEYESEKERE, V. R., STEIN-OAKLEY, A., SASANO, H., COULTER, C., COLE, T., SHEPPARD, K. E.: The type I and type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999. 69. p. 391-401.
13. KRUTSAY M.: Patológiai technika. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt. 1999.
14. LIEBICH, H.-G.: Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. 1990. p. 255-265.
15. MERZ, H., RICKERS, O., SCHRIMEL, S., ORSCHESCHEK, K., FELLER, A.C.: Constant detection of surface and cytoplasmic immunoglobulin heavy and light chain expression in formalin-fixed and paraffinembedded material. *Journal of Pathology*, 1993. 170. p. 257-264.
16. MICHAEL, A. E., THURSTON, L. M. and RAE, M. T.: Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, 2003. 126. p. 425-441.
17. NAPOLITANO, A., VOICE, M. W., EDWARDS, C. R. W., SECKL, J. R. and CHAPMAN, K. E.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in Adipocytes: Expression is Differentiation-dependent and Hormonally Regulated. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1998. vol. 64. no. 5-6. p. 251-260.
18. RAE, M. T. and HILLIER, S. G.: Steroid signalling in the ovarian surface epithelium. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 2005. vol.16. no.7. p. 327-333.

19. RICKETTS, M. L., VERHAEG, J. M., BUJALSKA, I., HOWIE, A. J., RAINEY, W. E. and STEWART, P. M.: Immunohistochemical Localization of Type 1 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1998. 83. p. 1325-1335.
20. RYAN, V. H., TRAYHURN, P., HUNTER, L., MORRIS, P. J., GERMAN, A. J.: 11-Hydroxy- $\beta$ -steroid dehydrogenase gene expression in canine adipose tissue and adipocytes: Stimulation by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Domestic Animal Endocrinology*, 2011. 41.p. 150-161.
21. SANDEEP, T. C. and WALKER, B. R.: Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 2001. vol. 12. no. 10.p. 446-453.
22. STULNIG, T. M., WALDHÄUSL, W.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in obesity and Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2004. 47. p. 1-11.
23. SUNAK, N., GREEN, D. F., ABEYDEERA, L. R., THURSTON, L. M. and MICHAEL, A. E.: Implication of cortisol and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the development of porcine (*Sus scrofa domestica*) ovarian follicles and cysts. *Reproduction*, 2007. 133. p. 1149-1158.
24. TESHIMA, T., HAR, Y., TAKEKOSHI, S., TERAMOTO, A., OSAMURA, R. Y., TAGAWA, M.: Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. *Domestic Animal Endocrinology*, 2009. 36. p. 3-12.
25. TETSUKA, M., MILNE, M., SIMPSON, G. E. and HILLIER, S. G.: Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor Genes in Rat Ovary. *Biology of Reproduction*, 1999. 60. p. 330-335.
26. TETSUKA, M., NISHIMOTO, H., MIYAMOTO, A., OKUDA, K. and HAMANO, S.: Gene Expression of 11 $\beta$ -HSD and Glucocorticoid Receptor in the Bovine (*Bos taurus*) Follicle During Follicular Maturation and Atresia: The Role of Follicular Stimulating Hormone. *Journal of Reproduction and Development*, 2010. vol.56. no.6. p. 616-622.



27. TETSUKA, M., YAMAMOTO, S., HAYASHIDA, N., HAYASHI, K. G., HAYASHI, M., ACOSTA, T. J. and MIYAMOTO, A.: Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. *Journal of Endocrinology*, 2003. 177. p. 445–452.
28. THURSTON, L. M., ABAYASEKARA, D. R. E. and MICHAEL, A. E.: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase expression and activities in bovine granulosa cells and corpora lutea implicate corticosteroids in bovine ovarian physiology. *Journal of Endocrinology*, 2007. 193. p. 299–310.
29. THURSTON, L. M., CHIN, E., JONAS, K. C., BUJALSKA, I. J., STEWART, P. M., ABAYASEKARA, D. R. E. and MICHAEL, A. E.: Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) proteins in luteinizing human granulosa-lutein cells. *Journal of Endocrinology*, 2003a. 178. p. 127-135.
30. THURSTON, L. M., JONAS, K. C., ROBERT, D., ABAYASEKARA, E. and MICHAEL, A. E.: Ovarian Modulators of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) Activity in Follicular Fluid from Bovine and Porcine Large Antral Follicles and Spontaneous Ovarian Cysts. *Biology of Reproduction*, 2003b. 68. p. 2157-2163.
31. THURSTON, L. M., NORSGATE, D. P., JONAS, K. C., GREGORY, L., WOOD, P. J., COOKE, B. A. and MICHAEL, A. E.: Ovarian modulators of type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) activity and intra-follicular cortisol:cortisone ratios correlate with the clinical outcome of IVF. *Human Reproduction*, 2003c. vol.18. no.8. p. 1603-1612.
32. TOMLINSON, J. W. and STEWART, P. M.: Cortisol metabolism and the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001. vol. 15 no. 1.p. 61-78.
33. WALKER, E. A. and STEWART, P. M.: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: unexpected connections. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 2003. vol. 14. no. 7. p. 334-339.