

## **37. OTDK Biológia Szekció**

# **A PCOS TERÁPIÁS VIZSGÁLATA AZ OXIDATÍV/NITROZATÍV STRESSZ, VALAMINT A GYULLADÁSOS PARAMÉTEREK TEKINTETÉBEN, PATKÁNYMODELLEN**

**Kiss Viktória Mónika**

*Biológus MSc szakos hallgató*

*II. évfolyam*

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Témavezetők:

Dr. Szabó Renáta

*Egyetemi adjunktus*

Dr. Matvon Denise

*Tudományos munkatárs*

## 1. Tartalomjegyzék

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Tartalomjegyzék.....                                                                                       | 1  |
| 2. Rövidítések jegyzéke.....                                                                                  | 2  |
| 3. Bevezetés.....                                                                                             | 3  |
| 3.1. Társadalmi áttekintés.....                                                                               | 3  |
| 3.2. Irodalmi áttekintés .....                                                                                | 4  |
| 3.2.1. A PCOS diagnózisa és tünetei.....                                                                      | 4  |
| 3.2.2. A hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG)-tengely.....                                                      | 6  |
| 3.2.3. A HPG-tengely szabályozási zavara és a PCOS.....                                                       | 7  |
| 3.2.4. Az oxidatív stressz és a gyulladásos folyamatok szerepe a PCOS kialakulásában és progressziójában..... | 8  |
| 4. Célkitűzés.....                                                                                            | 10 |
| 5. Anyagok és módszerek.....                                                                                  | 11 |
| 5.1. Vizsgált állatok és kísérleti protokoll .....                                                            | 11 |
| 5.2. Ivari ciklus meghatározása .....                                                                         | 12 |
| 5.3. Hisztológiai analízis .....                                                                              | 12 |
| 5.4. A szérum tesztoszteron koncentrációjának meghatározása.....                                              | 13 |
| 5.5. A szérum LH, FSH és petefészek ROS, nitrotirozin koncentráció meghatározása ELISA módszerrel .....       | 13 |
| 5.6. Gyulladásos markerek koncentrációjának meghatározása patkány Legendplex-szel ...                         | 14 |
| 5.7. Statisztikai analízis .....                                                                              | 14 |
| 6. Eredmények.....                                                                                            | 15 |
| 6.1. Ivari ciklus .....                                                                                       | 15 |
| 6.2. Az ováriumok makroszkópos és hisztológiai értékelése (hematoxilin-eozin festés) ....                     | 16 |
| 6.3. A gonadotropinok és a tesztoszteron hormon változása.....                                                | 18 |
| 6.3.1. Az LH és FSH koncentrációinak meghatározása.....                                                       | 18 |
| 6.3.2. A tesztoszteron koncentrációjának meghatározása .....                                                  | 19 |
| 6.4. Oxidatív és nitrozatív stressz paraméterek változása .....                                               | 20 |
| 6.4.1. A petefészek ROS koncentrációjának meghatározása .....                                                 | 20 |
| 6.4.2. Nitrotirozin szint változása .....                                                                     | 21 |
| 6.5. Gyulladásos markerek változása .....                                                                     | 22 |
| 7. Diskusszió.....                                                                                            | 24 |
| 8. Köszönetnyilvánítás .....                                                                                  | 31 |
| 9. Irodalomjegyzék.....                                                                                       | 32 |

## 2. Rövidítések jegyzéke

17 $\beta$ HSD1 – 17-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1  
3-NT – 3-nitrotirozin  
5 $\alpha$ RD – 5 $\alpha$ -reduktáz  
A4 – androsztendion  
AMH – anti-Müllerian hormon  
CTRL – kontrollcsoport  
CXCL-1 – C-X-C motívumú kemokin ligandum 1  
CYP19 – aromatáz  
DHEA – dehidroepiandroszteron  
DHEAS – dehidroepiandroszteron-szulfát  
DHT – dihidrotesztoszteron  
E2 – ösztradiol  
ELISA – enzim-kapcsolt immunszorbens vizsgálat  
FSH – follikulus stimuláló hormon  
GnRH – gonadotropin releasing hormon  
GRP54 – G-protein-kapcsolt receptor 54  
HPG – hipotalamusz-hipofízis-gonád-tengely  
HSD17B1 – 17-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1  
IL-1 – interleukin-1  
IL-12p70 - interleukin-12 p70 heterodimer  
IL-1 $\beta$  – interleukin-1 $\beta$   
IL-6 – interleukin-6  
IVF – in vitro fertilizáció  
Kiss1R – kisspeptin receptor 1  
KP10 – kisspeptin 10  
KP54 – kisspeptin 54  
LH – luteinizáló hormon  
NF- $\kappa$ B – nukleáris faktor kappa B  
NO – nitrogén-monoxid  
PCOS – policisztás ovárium szindróma  
RNS – reaktív nitrogénfajok  
ROS – reaktív oxigén gyök  
SHBG – nemi hormonokat megkötő globulinhoz  
SOD – szuperoxid-diszmutáz  
T – tesztoszteron  
TGF $\beta$  – transzformáló növekedési faktor béta  
TNF- $\alpha$  – tumor nekrozis faktor-alfa  
WHO – Egészségügyi Világszervezet  
ZDF – Zucker Diabetic Fatty

### 3. Bevezetés

#### 3.1. Társadalmi áttekintés

A klinikai terhesség létrehozásának képessége a termékenység, azonban ha 12 hónapos rendszeres, fogamzásgátlástól mentes, az ovuláció idejére eső házasság ellenére sem jön létre a kívánt terhesség, meddőségről, azaz infertilitásról beszélünk. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) egy 2023. áprilisi felmérése szerint a felnőtt lakosság mintegy 17,5 %-a küzd meddőséggel [1], melyben nők és férfiak egyaránt érintettek lehetnek [2]. A kiváltó okokat tekintve anatómiai, endokrinológiai, immunológiai, genetikai és hematológiai rendellenességek is egyaránt hozzájárulhatnak a meddőség állapotához. Mindezek mellett a nők életkorának növekedése fontos előrejelző tényezőnek tekinthető a termékenység elvesztése szempontjából [3], továbbá a környezeti tényezők, többek között az életmód és a környezeti hatások, szintén fontos indikátorok a meddőség kialakulásában [4].

Az endokrinológiai kiváltó okokat fókuszba helyezve, kiemelt figyelmet érdemel a policisztás ovárium szindróma (PCOS). A meddőség szempontjából, a PCOS a nők leggyakoribb endokrin rendellenessége. Egy olyan heterogén állapotnak tekinthető [4], amely általában serdülőkorban kezdődik, és a reprodukív korú nők 8-13 %-át érinti, azonban az esetek 70%-a diagnosztizálatlan. A PCOS oka ismeretlen, de a családi kórtörténetben előforduló vagy meglévő 2-es típusú cukorbetegség [5] és az elhízás [4] nagyobb kockázati tényezőt jelentenek. A reprodukív funkciók károsodása, illetve a bőrön jelentkező klinikai tünetek mellett a PCOS a mentális egészséget is igen megterhelheti, ugyanis szorongást, depressziót és negatív testképet is okozhat a kialakult tünetek miatt, amik társadalmilag is megbélyegezhetik az érintett nőket. Ez az állapot kihathat az érintett egyén családjára, kapcsolataira, de akár a munkájára és a közösségben való részvételére is [5], ami ronthatja akár az életminőségét is.

Annak ellenére, hogy az elmúlt 20 évben jelentős fejlődés történt a betegség diagnosztikájának és pathofiziológiájának a megértésében, a PCOS háttérfolyamatainak vizsgálata, valamint preventív és terápiás lehetőségei továbbra is a kutatások középpontjában állnak.

## 3.2. Irodalmi áttekintés

### 3.2.1. A PCOS diagnóza és tünetei

A betegségről először Hippokratész írt, már Kr. e. 377-460-ban: "azok a nők, akiknek menstruációja 3 napnál rövidebb vagy gyér, robusztusak, egészséges arcszínnel és férfias megjelenéssel rendelkeznek, mégsem törődnek a gyermekvállalással, és nem esnek teherbe" [6]. Hiába régóta ismert és kutatott rendellenesség, a PCOS-el küzdő nők csupán 30%-át diagnosztizálják [5].

A PCOS klasszikusan a Rotterdami kritériumok [7] alapján diagnosztizálható. A diagnózis akkor állítható fel, ha két tünet jelen van a következő három közül: a peteérés/ovuláció időleges elmaradása vagy megszűnése (anovuláció/amenorrhoea), a petefészekben ciszták jelenléte (morfológiai leírása ultrahangos vizsgálattal) és a hiperandrogenizmus klinikai és/vagy laboratóriumi jelei [4]. A tünetek azonban egyénenként és az idő múlásával is változhatnak, tehát egy igen heterogén rendellenességről beszélünk. A PCOS emellett az érintett egyén pszichikai állapotára is kihatással van a különböző tünetek és hormonális változások miatt, ezért fontos, hogy olyan kezelési és megelőzési módszereket fejlesszünk ki a jövőben, ami javítani tudja ezt a sokrétű rendellenes állapotot, ezzel több nőnek visszaadva az anyaság és az egészséges élet lehetőségét.

Ez egy életen át tartó állapot, amelynek a pontos okát sajnos még nem sikerült azonosítani, azonban feltételezhető, hogy epigenetikai eredetű betegség, melyet az egyén viselkedése, szokásai, valamint a méh környezetének állapota is befolyásolhat [8]. A PCOS a női nemi hormonok egyensúlyhiányának következménye, ugyanis felborul az LH/FSH arány, LH túlsúly keletkezik, emiatt rendellenes menstruációs ciklus alakul ki.

Egyik lényeges sajátága a policisztás petefészek, vagyis ciszták kialakulása a petefészek antrális tüszőkben, melyet úgy definiálnak, hogy legalább 20 tüsző jelenik meg petefészenként, melyek térfogata legalább  $10 \text{ cm}^3$  [9]. Ezek a ciszták folyadékkal teli üreges képletek, amelyek a petesejtet tartalmazzák, ugyanis a petesejt nem ürült ki az esetleges megtermékenyítéshez, ahogyan normális esetben kellett volna. A petesejt cisztává alakulása ezáltal megakadályozza az ovulációt, ugyanis az blokkolva van, aminek következtében a menstruációs ciklus megszakad, ami amenorrhoeát eredményez [10], vagyis a menstruációs időszakok akár teljesen el is maradhatnak [11].

Emellett a tesztoszteron szintje a vérben pozitív összefüggést mutat a menstruációs ciklus hosszával és a tüszők számával [12], ennek értelmében a magasabb tesztoszteron szint

elősegítheti a PCOS kialakulását és fejlődését a hiperandrogenizmus kialakulása által. A hiperandrogenizmus a legfőbb biokémiai jellemzője a PCOS-nek. A hiperandrogenizmus olyan állapot, amely során a szervezetben túlzott mennyiségű androgén hormon található, ami számos klinikai tünettel járhat együtt az érintett nők esetében. A hiperandrogenizmus leggyakoribb és legspecifikusabb klinikai jele a hirsutizmus, ami túlzott, férfias mintázatban megjelenő végleges szőrzet megjelenését jelenti [13], vagyis ennek során végleges szőrzet nő az alsó arc, az áll és a nyak területén [14-16]. Ezekre a végleges szőrszálakra jellemző, hogy 5 mm-nél hosszabbak, valamint sűrűbb, vastagabb szerkezetet mutatnak [13]. A szőrnövekedés csak bizonyos testrészeken erősödik, a PCOS-el küzdő nők ugyanis androgén alopeciában is szenvednek [17], ami férfias hajhulláshoz vezet. Egy kevésbé specifikus, de annál kellemetlenebb tünet az akné, amely a megnövekedett faggyútermelés következtében alakul ki a túlzott androgéntermelés miatt [18, 19]. Külső tünet lehet még a centrális adipozitás, diszfunkcionális zsírszövettel [20], vagyis az alsó hasi területen, a deréknál és a csípők körül elhelyezkedő zsírlerakódás. Mindemellett a túlzott androgének károsíthatják a granulosa sejteket és megváltoztathatják a tüszők mikrokörnyezetét. Ez a folyamat tüszőatresziához vezethet, amely során a tüszők előzetes degenerációja vagy pusztulása következik be, ami csökkenti a peteérés esélyét és befolyásolja a peteérés minőségét [21].

A környezeti tényezők, mint például az elhízás okozta túltápláltság, jelentős hatást gyakorolhatnak a szindróma fenotípusára [20, 22, 23]. A túlsúly a PCOS minden aspektusát súlyosbítja a mögöttes anyagcserezavarok miatt [24], ezért az elhízott betegeknél megfigyelhető, hogy reprodukív és anyagcsere szempontból kedvezőtlenebb jellemzők jelennek meg. Az elhízás társulhat nagyobb mértékű inzulinrezisztenciával és hiperinzulinémiával, valamint a központi zsírszövet nagyobb tömegével és károsodott funkciójával. A kutatások szerint az inzulinrezisztencia és a diszfunkcionális zsírszövet hozzájárulhat a hiperandrogenizmus és az anovuláció súlyosbodásához is [20].

A PCOS valódi összetettségét az alapul szolgáló mechanizmusok és a kísérő folyamatok hálózata jelenti. Mélyreható megértése nem csupán a tünetek és a hormonális változások vizsgálatát igényli, ugyanis a hormonális egyensúlyzavar mögött meghúzódó folyamatok az idegrendszer szabályozásával is szorosan összefonódnak. Az autonóm idegrendszer és a központi idegi struktúrák, mint például a hipotalamusz és az agyalapi mirigy, kulcsszerepet töltenek be a hormonális tengelyek irányításában, és ezáltal a PCOS-t kísérő endokrin változásokban. Az integrált megközelítés tehát kulcsfontosságú a teljeskörű megértéshez és a hatékony kezelési stratégiák kifejlesztéséhez.

### 3.2.2. A hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG)-tengely

A hipotalamusz az adenohipofízis hormonszekréciója révén kiemelt szabályzó szereppel bír a petefészkek endokrin funkciójában, a hipotalamusz-hipofízis-gonád (HPG)-tengelyen keresztül. A hipotalamusz időzített, pulzáló ciklusokat létrehozva képes irányítani az adenohipofízisből történő follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) felszabadulást [25]. Magát a gonadotropin-releasing hormont (GnRH) több neurotranszmitter is szabályozza (pl. dopamin, szerotonin, noradrenalin, glutamát stb.), azonban az egyik legfontosabbnak a Kisspeptin tekinthető, amely a GnRH felszabadulásának serkentése révén a reprodukív tengely központi irányítója. Emellett a termékenység fenntartásában is nélkülözhetetlen, ugyanis kódoló génjének inaktiváló mutációja a kutatások szerint meddőséget okoz [26]. A termelt ováriumhormonok az egész rendszerre való visszacsatolásukkal szabályozni tudják a GnRH és gonadotrop hormonok termelődését, így egy igen összetett és kontrollált rendszerről beszélünk, amely a termékeny korú nők havi ciklusát irányítja. Az FSH és LH hormonok összehangoltan működnek a női nemi ciklus során, ezáltal szerepet játszanak a szexuális fejlődésben és reprodukcióban.

Az LH funkciói közé tartozik az ovuláció kiváltása, vagyis a petefészkek tüszőjének megrepedését és a benne található érett petesejt felszabadulását indukálja [27], továbbá a sárgatest kialakításának, fenntartásának és a progeszteron termelésnek egy meghatározó regulátora [28]. Az LH-szint változása kulcsfontosságú, ugyanis az LH-impulzusok mintázata megváltozik a menstruációs ciklus során. Az impulzusfrekvencia fokozatosan nő a follikuláris fázisban, és az amplitúdó is megnő a ciklus közepén bekövetkező ovulációs LH-emelkedés során [29]. Az ovulációt követően az LH impulzusfrekvencia lelassul az ösztrogén visszacsatoló hatása miatt [30]. A másik gonadotropin, az FSH, a follikulusokérésének fő szabályzója. Nőkben a petefészkek theca-sejtjeiből szteroid hormon (androsztendion és tesztoszteron) termelődik az LH hatására [31]. FSH hatására a petefészkek granulosa sejtjeiben [32] ezután a tesztoszteron az  $5\alpha$ -reduktáz és az aromatáz (CYP19) enzimek által dihidrotesztoszteronná (DHT) és ösztradiollá (E2) alakulhat át [33]. Az androsztendionból a granulosa sejtekben ösztroon képződik, amit végül a  $17\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1-es típusa ( $17\beta$ HSD1, HSD17B1) alakíthatja  $17\beta$ -ösztradiollá [32]. Az androgén hormonok koleszterinből képződnek a petefészkek theca-sejtjeiben az LH hatására, valamint a mellékvese zona reticularis zónájában az adrenokortikotróp hormon hatására. Emellett kis mennyiségű androgén hormon akár a perifériás szövetekben is termelődhet [34]. Ennek köszönhetően tehát a szérumszintje reprodukív korú nőknél általában alacsonyabb szinten marad.

A nők esetében ötféle androgén termelődhet, ezek lehetnek a dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS), a dehidroepiandroszteron (DHEA), az androsztendion (A4), a tesztoszteron (T) és a dihidrotesztoszteron (DHT). A DHEAS-t csak a mellékvese zona reticularis termeli, illetve a keringésben a DHEA alakulhat belőle. A DHEA-t nagyobb arányban a mellékvese termeli, de kisebb mennyiségben a petefészek is képes szekretálni. Az A4-et viszont a mellékvese és a petefészek egyforma mértékben szintetizálja [35], mint az androgén hormonok bioaktív formáját, a tesztoszteront. A tesztoszteron azonban képes átalakulni az 5 $\alpha$ -reduktáz (5 $\alpha$ RD) segítségével DHT-vé a perifériás szövetekben (májban, zsírban), illetve a mellékvese zona fasciculata a tesztoszteron mellett DHT-t is képes szintetizálni kisebb mennyiségben [11, 35].

### **3.2.3. A HPG-tengely szabályozási zavara és a PCOS**

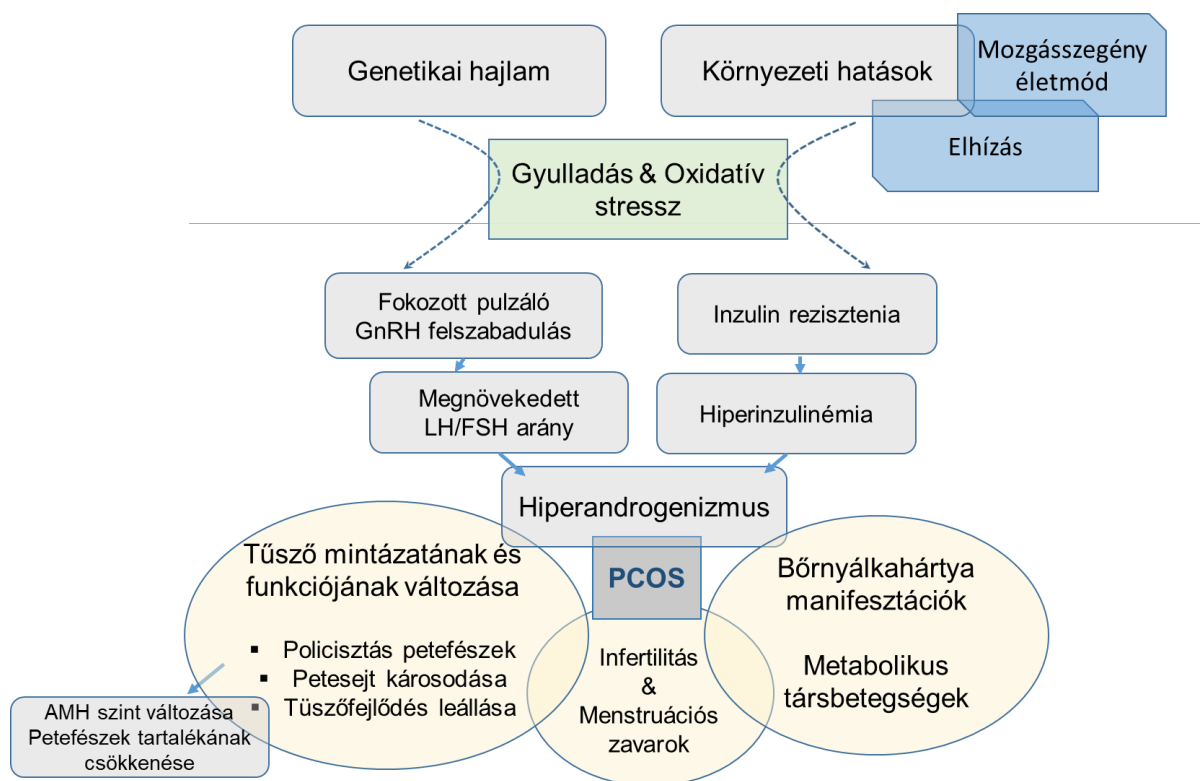
A nemi hormonszintek és a petefészek tüszőnövekedésének szabályozásában meghatározó szerepe van a HPG-tengelynek [30], ezáltal a PCOS patofiziológiájában is, ugyanis a hipotalamusz által szabályozott pulzáló GnRH szekréció zavara tekinthető a PCOS egy fő tényezőjének [36]. A GnRH szekréció megváltozásának az egyik fő befolyásolója lehet a kisspeptin nevű hipotalamikus polipeptid, amely a GnRH-impulzusok kialakulásának kulcsfontosságú szabályozója. A GRP54 receptorokon, más néven Kiss1R-en keresztül aktiválja a GnRH-szekréciót [37]. A megváltozott kisspeptin szekréció, és az ezáltal fokozott GnRH-impulzus frekvencia és amplitúdó elősegítheti az LH-szintézist az FSH-szintézissel szemben, ami magas LH/FSH arányhoz vezet a PCOS-ben szenvedő nőknél [38]. Emellett a legújabb vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a kisspeptin a hipofízis sejteihez is képes direkt módon kötődni, hogy az LH felszabadulásának növekedését okozza [39], ami az androgén hormonok egyensúlyának felborulásához vezethet.

A PCOS-ben megváltozott morfológiájú granulosa sejtek által termelt anti-Müllerian hormon (AMH) túlzott termelése gátolja az aromatáz aktivitást, valamint megszünteti FSH aktiváló hatását a granulosa sejtekre, ami csökkent ösztadiol termeléshez vezet [40]. Az aromatáz gátlása a granulosa sejtekben [41], valamint az LH/FSH arány megváltozása rengeteg negatív hatást vonz maga után. Károsítja az ösztrogén és az FSH szintézisét, ezáltal gátolja a tüszőnövekedést és az ovulációt, felborítja a gonadotrop hormonok egyensúlyát, ezáltal LH-túlsúly keletkezik, ami a tesztoszteron szintjének emelkedéséhez [30], ebből fakadóan hiperandrogenizmushoz és a tüszőfejlődés leállításához vezet [42]. Végeredményben az egész egy önmagát erősítő folyamatot alkot, ugyanis a nemi hormonok jelentősen befolyásolják az

agy neuronális aktivitását, így elősegítik a petefészek diszfunkcióját és a reprodukciós zavarokat a PCOS-es nőknél [41].

### 3.2.4. Az oxidatív stressz és a gyulladásos folyamatok szerepe a PCOS kialakulásában és progressziójában

A PCOS kóros, alacsony fokú gyulladásos állapotnak tekinthető [10], ugyanis a hormonok mellett az oxidatív stressz és az immunrendszer is fontos szerepet játszik a pathofiziológiájában [43] (1. ábra).



**1. ábra:** A policisztás ovárium szindróma mechanizmusainak összefoglalása

*Forrás: Lőrincz és mtsai., 2024, nyomán [40].*

*GnRH= gonadotropin releasing hormon; LH= luteinizáló hormon; FSH= follikulus stimuláló hormon; PCOS=policisztás ovárium szindróma; AMH= anti-Müllerian hormon.*

A gyulladás szinte minden betegség alapvető velejárója, hiszen bármilyen stresszorzall vagy gyulladásos ágenssel való találkozás, gyulladást vált ki a szervezetben [10]. Számos tanulmány kimutatta, hogy az oxidatív keringési markerek szignifikánsan magasabbak a PCOS-ben szenvedő betegeknél az egészséges egyénekhez képest, valamint potenciális kiváltó

tényezőnek tekintik a PCOS pathogenezisében is [44]. Oxidatív stressz akkor következik be, amikor az oxidánsok és antioxidánsok közötti egyensúly felborul, ami túlzott mennyiségű reaktív oxigén gyök (ROS) képződéshez vezet, vagyis a szervezet nem tud megfelelően védekezni a szabad gyökök káros hatásai ellen. A ROS akkumuláció eredményeként a szervezet védekező mechanizmusai zavart szenvednek, ami olyan káros hatásokhoz vezethet, mint például a DNS-károsodás vagy a sejthalál [43]. A ROS az aerob szervezetek oxigén metabolismusának termékei, amelyek több forrásból származhatnak, beleértve az oxidatív foszforilációt, a máj enzimszereit, a méregtelenítő reakciókat és a környezeti tényezőket is [45]. Ezek másodlagos hírvivőként működhetnek az emlősejtekben, befolyásolva a génexpressziót és a sejtek működését, növekedését, differenciálódását és halálát [46, 47].

Fiziológias körülmények között a sejtekben jelenlévő antioxidánsok megakadályozzák a szabad gyökök ezen káros hatásait. Ezek az enzimatis és nem-enzimatis rendszerek, többek között a szuperoxid-diszmutáz (SOD), kataláz, glutation vagy az E, C, A vitaminok [48, 49]. Emellett nyomelemek, például a réz, cink, mangán és szelén is fontosak az antioxidáns rendszer működéséhez [50].

Egyre több kutatás erősíti azt a feltevést is, hogy a hiperandrogenizmushoz kapcsolódó immunstressz és gyulladásos környezet közvetítő szerepet játszhat a reprodukív rendszer diszfunkciójában a HPG-tengely zavarán keresztül [41, 51, 52]. A PCOS-sel társítható hiperandrogenizmus változatosan hat az immunsejtek különböző altípusaira [53]. A petefészekben és zsírszövetben a makrofágok a leggyakrabban előforduló immunsejtek, amelyek fontos szerepet játszanak a gyulladásos válaszban és az immunrendszer egyensúlyában. A menstruációs ciklus során a makrofágok szintje változik, ami azt sugallja, hogy a progeszteron hatás érvényesül. A PCOS-ben az elhízás és az inzulinrezisztencia nagyon gyakori, ami az M2 típusú gyulladáscsökkentő makrofágok átmenetét eredményezi az M1 pro-inflammatorikus fenotípusba [54]. Az M1 makrofágok viszont nagy mennyiségű gyulladásos citokint termelnek, mint például az interleukin-1 (IL-1), IL-6 és a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ) [54, 55], amelyek tovább fokozzák a PCOS kórállapotát, súlyosbítva az inzulinrezisztenciát és a hiperandrogenizmust [56]. Az androgének mennyiségének növekedésével a myeloid prekursor sejtek fokozott neutrofil termelésbe kezdenek, ami gyakran neutrofil túltengést (neutrofilia) eredményez, amely szintén tovább fokozza a gyulladásos citokinek termelődését, mint a TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  és IL-1 $\beta$ , ezáltal súlyosbítva a PCOS pathofiziológiáját [57].

#### 4. Célkitűzés

A PCOS egy krónikus endokrinológiai kórkép, amely a fertilis korú nők 8-13 %-át érinti [5], így a megfelelő terápiás eljárás megválasztásával számos nő életminősége javulhat. Kutatásunkban a PCOS okozta kórfolyamatok mérséklésére a II-es fázisú klinikai vizsgálatban levő TAK-448 (más néven MVT-602) nevű kisspeptin receptor agonistát alkalmaztuk.

Kísérletünkkel tisztázni kívántuk, hogy:

1. A DHEA-indukált PCOS állatmodellben a hormonális vizsgálatok mellett hogyan változik az oxidatív/nitrozatív stressz, valamint a gyulladásos folyamatok?
2. A TAK-448/MVT-602 kezelés hogyan módosítja a PCOS-sel társítható hormonális változásokat a gonadotropinok, valamint a tesztoszteron hormon tekintetében?
3. Hogyan befolyásolja a TAK-448/MVT-602 kezelés az oxidatív/nitrozatív stressz paramétereit, valamint a gyulladásos folyamatokat?

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. Vizsgált állatok és kísérleti protokoll

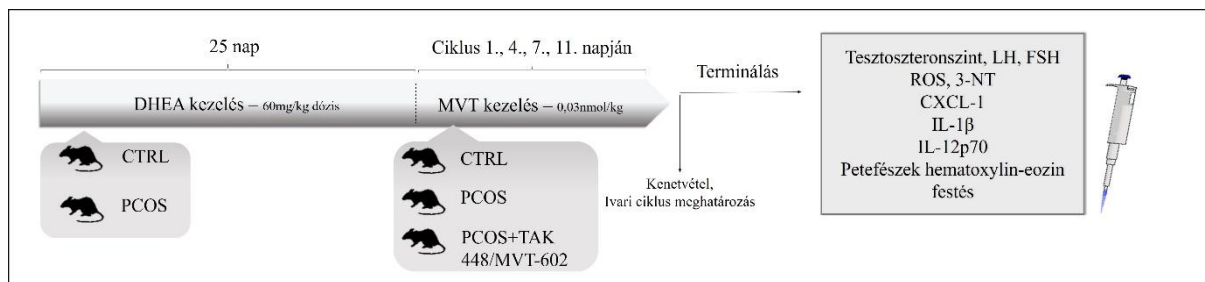
Kísérleteinkhez 175-200 gramm súlyú nőstény Harlan-Wistar patkányokat (Toxi-Coop Zrt., Magyarország) használtunk. Az állattartási körülmények a következők voltak: 20-22 °C hőmérséklet, 40-50 %-os páratartalom, 12 órás világos-sötét ciklusokban. Az etetés granulált patkány táppal, az itatás pedig csapvízzel történt *ad libitum*.

Az állatok tartása az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU előírásai alapján, a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998), a 40/2013. II. 14. kormányrendeletnek megfelelően történt. Munkánkat a XX/964/2023. számú állatkísérletes engedély előírásainak megfelelően végeztük.

Egyhetes akklimatizációs periódust követően a PCOS kórkép kialakítására az állatok egy részét 60 mg/ttkg dózisú dehidroepiandrosteronnal (DHEA) kezeltük 25 napig, naponta egyszer, szubkután (s.c.). A kontrollcsoporthoz (CTRL) tartozó egyedeket a DHEA vivőanyagával, szezámolajjal kezeltük 0,2 mL végtérfogatban. A DHEA-kezelt PCOS állatok egy részét 0,03 nmol/ttkg dózisú TAK-448/MVT-602 kezelésben részesítettük az 1., 4., 7. és 11. napokon. A TAK-448/MVT-602-t 0,9 %-os fiziológiás sóoldatban oldottuk, majd 0,2 mL végtérfogatban injekcióztuk s.c.

A terminálási napon May-Grünwald festéssel meghatároztuk az állatok ivari ciklusát. Annak érdekében, hogy szöveti szinten is igazolni tudjuk a PCOS kialakulását, illetve a TAK-448/MVT-602 kezelőanyag potenciális jótékony hatását, az állatok egy részének petefészek mintáit formalinba helyeztük, majd a szövettani értékeléshez hematoxin-eozin festést alkalmaztunk (2. ábra).

A biokémiai vizsgálatokra szánt mintákat –80 °C-ra helyeztünk a későbbi feldolgozásig.



**2. ábra:** Kísérleti protokoll

*DHEA= dehidroepiandroszteron; CTRL=kontroll; PCOS=policisztás ovárium szindróma; LH= luteinizáló hormon, FSH= follikulus-stimuláló hormon, ROS= reaktív oxigén fajták, 3-NT= nitrotirozin, CXCL-1= C-X-C motívumú kemokin ligandum 1; IL-1 $\beta$ =interleukin-1 $\beta$ ; IL12p70= interleukin-12 p70 heterodimer.*

## 5.2. Ivari ciklus meghatározása

Az ivari ciklus meghatározása éber állapotban történik, amelynek során az állatokat korlátoztuk, farkukat felemelve pedig láthatóvá tettük a hüvelyt. Vattapálca segítségével, melyet szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldattal nedvesítettünk meg, hüvelyi kenetet vettünk. A vattapálcát óvatosan a hüvelyfalhoz görgettük, majd a vattapálcát óvatosan végig húztuk a tárgylemezen. A hüvelykenet festéséhez először a Giemsa-oldatot 1:1 arányban hígítottuk, 15 ml desztillált vízhez adva 15 ml Giemsa oldatot, majd ezt félretettük. A preparátumokat először May-Grünwald oldattal kezeltük: körülbelül 7-10 csepp oldatot pipettáztunk a tárgylemezre, és 2,5 percig hagytuk állni, majd az oldatot leöntöttük a tárgylemezről. Ezután a hígított Giemsa-oldatot csepegtettünk rá, amelyet 15 percig hagytunk a lemezeken, hogy megfelelően megtörténjen a festődés. A festés végeztével desztillált vízzel öblítettük a mintákat, majd levegőn hagytuk száradni. Végezetül Zeiss Axio Imager.Z2 fénymikroszkóppal vizsgáltuk a keneteket a sejttípusok azonosítása céljából [58].

## 5.3. Hisztológiai analízis

A petefészek szövetmintákat egy éjszakán át szobahőmérsékleten 4%-os formaldehidben fixáltuk. A szöveteket szövettani kazettákba helyeztük, majd fokozatosan etanolból xilolba dehidratáltuk, és Leica TP1020 szövetfeldolgozóban paraffinba ágyasztuk. A metszeteket 5  $\mu$ m vastagságban keresztbe vágtuk, valamint Leica ST5010 Autostainer-rel standard hematoxin és eozin festéshez feldolgoztuk. A festést követően a szövetet tartós

rögzítőközeggel (CV Ultra, Leica) montíroztuk. A metszeteket AxioCam ICc 5 kamerával felszerelt Zeiss Axio Imager.Z2 fénymikroszkóppal megvizsgáltuk és fotókat készítettünk.

#### **5.4. A szérumszteron koncentrációjának meghatározása**

A kísérleti periódus végén az állatokból szívpunkcióval szérumszteron mintákat gyűjtöttünk. A mintákat 3200 r.p.m., 18 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd Immulight 2000 XPI (Siemens) immunkémiai automata segítségével meghatároztuk a szérumszteron koncentrációt, amelyet nmol/L-ként fejeztünk ki.

#### **5.5. A szérums LH, FSH és petefészek ROS, nitrotyrozin koncentráció meghatározása ELISA módszerrel**

A kísérleti protokoll végén az állatoktól szívpunkcióval vért gyűjtöttünk, a vérvételi csöveket 3200 r.p.m, 18 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszókat -20 °C-on tároltuk az ELISA mérések elvégzéséig. A petefészek mintákat jéghideg foszfát pufferben (pH 7,4) Ultra-Turrax homogenizáló segítségével (2 x 10 sec) homogenizáltuk. Centrifugálás után (20 perc, 2500 rpm, 4 °C) a felülúszókat leszívtuk, majd ELISA mérésekhez használtuk. A gyártó adatlapjának megfelelően (Gen Asia Biotech Co., Ltd., Shanghai, Kína) vagy 40 µL petefészek szöveti felülúszó vagy 50 µL standard oldatot tettünk a monoklonális antitestekkel előzetesen bevont lyukakba. Ezenkívül, a felülúszót tartalmazó lyukak tartalmát 10 µL biotinnal jelölt ellenanyaggal egészítettük ki. Ezt követően 50 µL Streptavidin-HRP-t is hozzáadtunk, mind a felülúszót, mind a standardot tartalmazó lyukakba, amely ennek következtében a biotinnal jelölt antitesttel immunkomplexet képezett. Az inkubációs eljárás után (60 perc 37 °C-on) a lemez 5x átmosásra került, így a nem kötött enzimek eltávolítottak a lyukakból. A színreakcióhoz 50 µL A és B szubsztrát oldatot adtunk hozzá minden mintához és standard sorhoz, majd a teljes reakcióelegyet 10 percig inkubáltuk 37 °C-on fényvédett helyen. Utolsó lépésként 50 µL Stop oldatot pipettáztunk a reakcióelegyhez, az optikai denzitást 450 nm-en mértük (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A petefészek ROS értékeket U/mg fehérjében, a 3-NT értékét mmol/mg fehérjében fejeztük ki, míg az LH és FSH értékeket mIU/mL-ben adtuk meg.

## **5.6. Gyulladásos markerek koncentrációjának meghatározása patkány Legendplex-szel**

A LEGENDplex™ Rat Inflammation Panel V02 egy gyöngyalapú multiplex assay panel, amely alkalmas különböző áramlási citométereken való használatra. Ez a panel több patkány citokin egyidejű mennyiségi meghatározását teszi lehetővé. A panelben szereplő citokinek többségét a veleszületett immunsejtek termelik, összekötve a veleszületett és az adaptív immunitást más sejtekkel. Ez a vizsgálati panel nagyobb kimutatási érzékenységet és szélesebb dinamikai tartományt biztosít, mint a hagyományos ELISA módszer. Az IL-1 $\beta$ , IL-12p70 és a CXCL-1 értékeket pg/mg fehérjeként fejeztük ki.

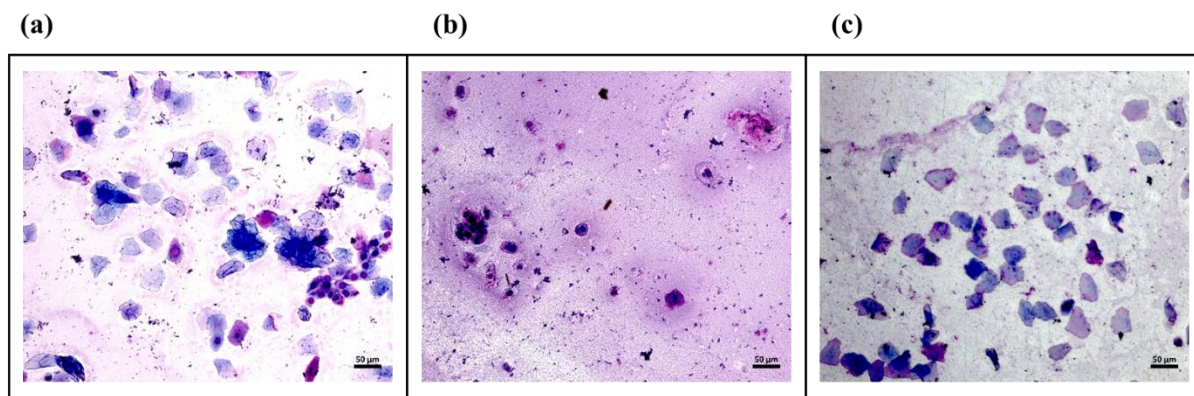
## **5.7. Statisztikai analízis**

Az adatok normál eloszlását és a variancia homogenitását Shapiro-Wilk teszttel igazoltuk. A csoportok közötti különbségek elemzéséhez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk Tukey post-hoc teszttel, és a  $p \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzést a SigmaPlot 12.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) programmal végeztük.

## 6. Eredmények

### 6.1. Ivari ciklus

A rácsálók ivari/ösztusz ciklusa négy fázisból – proösztusz, ösztusz, metösztusz és diesztusz – álló ciklus, amely körülbelül 4-5 napig tart. A hüvelyváladék háromféle sejttypusból áll, és ezen sejtek összetétele alapján határozható meg az aktuális fázis [59]. A ciklus csúcspontját az ösztusz képezi (10-18 óra), melynek elejére esik az ovuláció. Az ilyen fázisból származó hüvelykenetben elszarusodott, nem festődő magvú hámsejtek találhatók. Ezt követi a metösztusz (24-30 óra), a leépítési szakasz, amelyben elszarusodott hámsejtek, leukociták és hámsejtek figyelhetők meg. A következő fázis a diösztusz (50-60 óra), amelyre magvas hámsejtek, leukociták és nyálka jellemző. Utána az ösztusz megelőző proösztusz (12 óra) következik, amelyben csak magvas hámsejtek találhatók [58-60]. Jelen kísérleti modellünkben, a kezelési periódus végén három fázist figyelhattunk meg az egyes állatcsoportokban. A CTRL állatok esetében az ösztusz fázis dominált (3,a), a PCOS csoportban minden egyed diösztusz ciklusban (3,b) volt, míg a PCOS+MVT-602/TAK-448 kezelésben részesülő állatok proösztusz fázisban voltak (3,c).



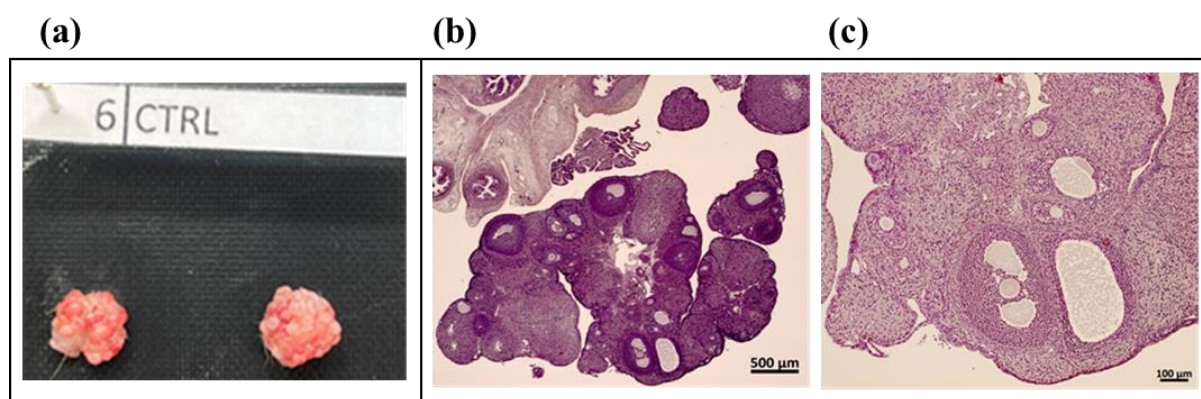
**3. ábra:** A kísérleti periódus végén meghatározott ivari ciklusok reprezentatív fotói

(a) CTRL – ösztusz fázis; (b) DHEA-kezelt – diösztusz fázis; (c) TAK-448/MVT-602 kezelt – proösztusz fázis.

*CTRL=kontroll; DHEA=dehidroepiandroszteron.*

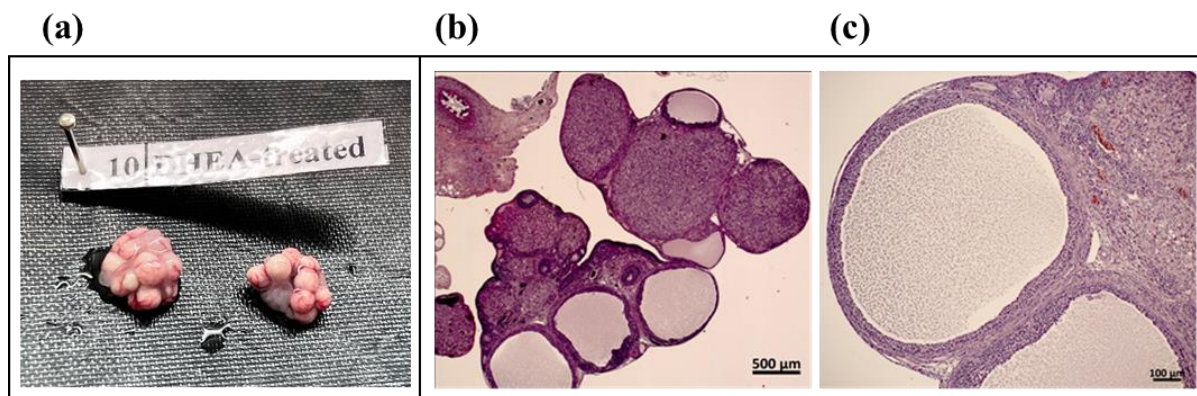
## 6.2. Az ováriumok makroszkópos és hisztológiai értékelése (hematoxin-eozin festés)

A petefészkek változásainak makroszkópos vizsgálata mellett, hematoxin-eozin festést követően szövettani analízist is végeztünk. A CTRL állatok petefészkei normál morfológiát mutattak, ahol a tüszők megfelelően fejlődtek és jól definiált antrális struktúrákat képeztek. Az ivari ciklus fázisának megfelelően a tüszők száma és állapota is stabil volt. Ezzel szemben, a PCOS petefészkekben számos kóros elváltozást figyeltünk meg, beleértve a megnagyobbodott follikulusokat. A hisztológiai képeken cysticus és atreticus follikulusok láthatók. Az MVT-602/TAK-448 kezelés hatására azonban a vizsgált petefészkek morfológiája szemmel látható javulást mutatott, a cisztás struktúrák csökkenését észleltük. A tüszők mérete és száma a normálhoz közelített. A hisztológiai képeken az antrális tüszők dominanciája látható.



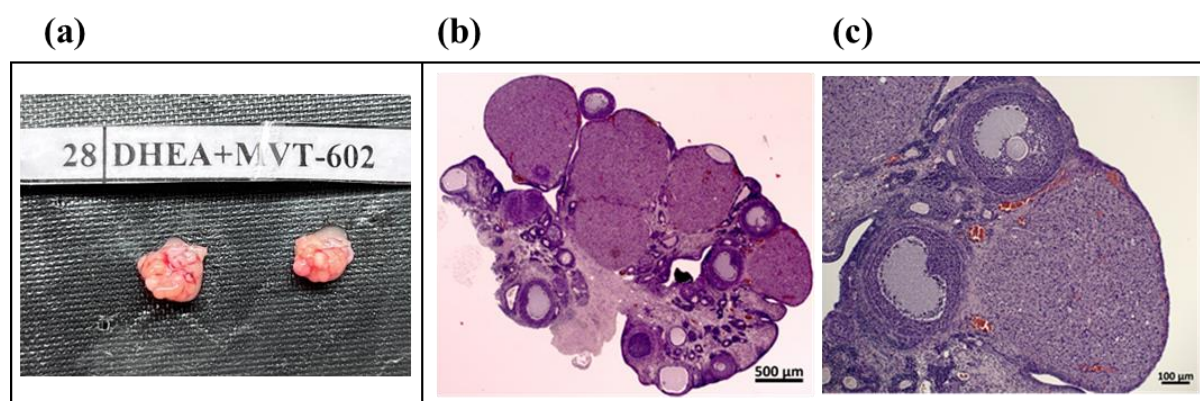
**4. ábra:** kontroll állat petefészkei, makroszkópos (a) és hisztológiai analízise 25X (b) és 100X nagyításban (c).

*CTRL=kontroll.*



**5. ábra:** DHEA kezelt állat petefészkei, makroszkópos (a), 25X (b) és 100X nagyításban (c).

*DHEA= dehidroepiandroszteron.*



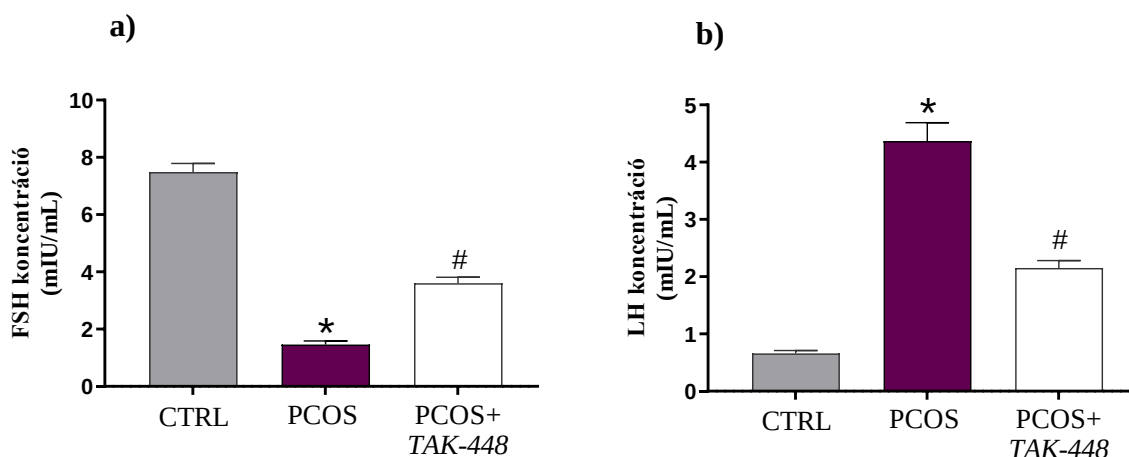
**6. ábra:** DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt állat petefészkeinek makroszkópos fotója (a) és hisztológiai analízise 25X (b) és 100X nagyításban (c).

*DHEA= dehidroepiandroszteron.*

### 6.3. A gonadotropinok és a tesztoszteron hormon változása

#### 6.3.1. Az LH és FSH koncentrációinak meghatározása

A gonadotropin koncentrációk változásának meghatározásához mértük az LH, illetve az FSH koncentrációit szérumból. Az eredményekből látható, hogy a PCOS csoportban az állatok LH szintje jelentősen megnövekedett, míg FSH szintjük csökkent a kontrollcsoporthoz viszonyítva, mely a PCOS-ra jellemző hormonális zavart tükrözi. A TAK-448 kezelés hatására az LH kóros szintje mérséklődött, ezzel szemben az FSH szintje emelkedett a PCOS csoporthoz viszonyítva. Eredményeink arra utalnak, hogy a TAK-448 kezelés helyreállította a gonadotrop hormonok egyensúlyát PCOS állatmodellekben, ami hozzájárulhat a reprodukív működés normalizálásához. Az eredményeket a 7.a) és 7.b) ábra mutatja be.



**7.a) és 7.b) ábra:** Szérum LH a) és FSH koncentrációja b).

(LH; mIU/ml-ben kifejezve; FSH; mIU/ml-ben kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 10$ , \* $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között, # $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között. CTRL= kontroll, DHEA= dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, LH= luteinizáló hormon, FSH= follikulus-stimuláló hormon.

### 6.3.2. A tesztoszteron koncentrációjának meghatározása

Az 1. táblázat a szérum tesztoszteron szintjét hivatott bemutatni három a kísérleti csoportban. A kontrollcsoport esetén a szérumban detektált tesztoszteronszint alacsony maradt, amely a normál fiziológiai értékeket tükrözi. A PCOS csoportban ezzel szemben a tesztoszteron koncentrációja szignifikánsan emelkedett, mely a PCOS egyik fő biokémiai jellemzőjére, a hiperandrogenizmusra utal. TAK-448/MVT-602 kezelés hatására a tesztoszteronszint azonban jelentős mértékben csökkent – a kontroll értékekkel megegyező szintre – amely alátámasztja a kezelés terápiás hatékonyságát PCOS modellben.

| Tesztoszteronszint      |                            |                              |                              |
|-------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                         | CTRL                       | PCOS                         | PCOS+TAK-448/<br>MVT-602     |
| Szérum<br>tesztoszteron | $<0,69 \pm 0,00$<br>nmol/L | $27,62 \pm 5,69$<br>nmol/L * | $<0,69 \pm 0,00$<br>nmol/L # |

**1. táblázat:** Szérum tesztoszteron koncentrációja

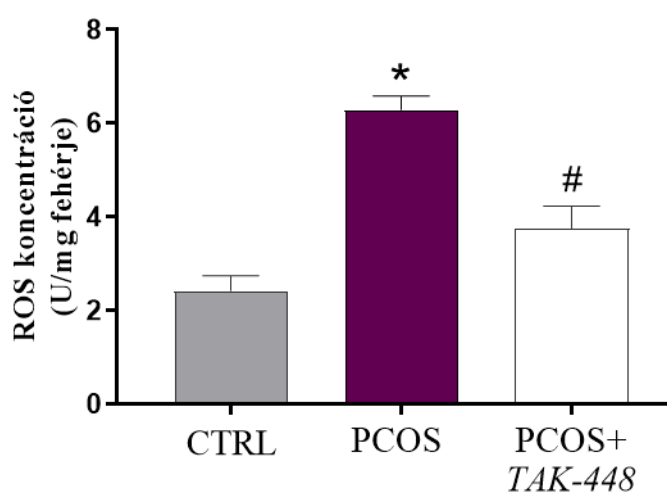
*Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 10$ , \*  $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között, #  $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.*

*CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma.*

## 6.4. Oxidatív és nitrozatív stressz paraméterek változása

### 6.4.1. A petefészek ROS koncentrációjának meghatározása

A 8. ábra a ROS koncentrációjának változását mutatja az állatok petefészkében. A PCOS állatok ROS koncentrációja háromszoros emelkedést mutatott a kontroll értékekhez viszonyítva, amely jelzi az oxidatív stressz fokozódását ebben a betegségmodellben. Az ábrán egyértelműen látható, hogy a TAK-448/MVT-602 kezelés hatására a ROS koncentráció jelentősen csökkent, ezáltal mérsékelve a petefészekben megjelenő oxidatív stressz mértékét.



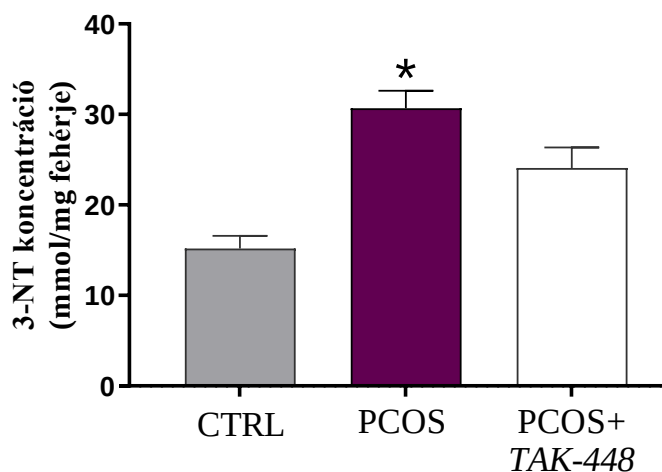
**8. ábra:** Petefészek ROS koncentrációja

(ROS; U/mg fehérjeként kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 8-10$ , \* $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között, # $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.

CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, ROS = reaktív oxigén fajták.

#### 6.4.2. Nitrotirozin szint változása

A 3-NT koncentrációban a PCOS állatok esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a kontroll állatokhoz képest. Ezzel szemben, a TAK-448/MVT-602 kezelés következtében a magas 3-NT szint mérséklődött. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a TAK-448/MVT-602 kezelés enyhítheti a nitroztatív stresszt PCOS-ben (9. ábra).



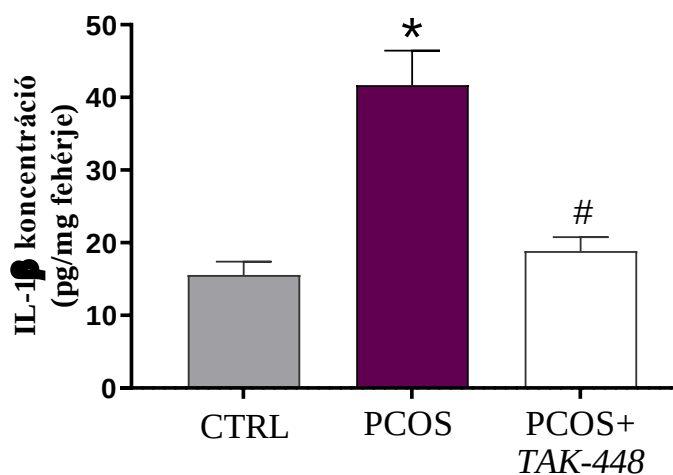
**9. ábra:** Petefészek nitrotirozin koncentrációja

(3-NT; mmol/mg fehérjeként kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6-9$ ,  $*p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között,  $^{\#}p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.

CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandrosteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, 3-NT= 3-nitrotirozin.

## 6.5. Gyulladásos markerek változása

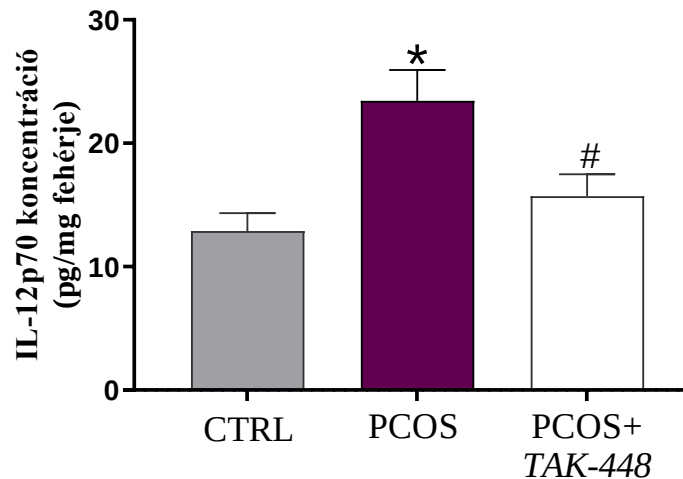
A TAK-448/MVT-602 gyulladásos markerek szintjére kifejtett hatásainak felderítése érdekében, több gyulladásokeltő citokin koncentrációját: IL-1 $\beta$  (10. ábra), IL-12p70 (11. ábra), és CXCL-1 (12. ábra) is meghatároztuk petefészek szövetből. A CTRL csoport állatainak petefészkében alacsony koncentrációban voltak jelen az előbb említett gyulladásos markerek. Ezzel szemben, a PCOS csoportban a vizsgált gyulladásos citokinek szignifikáns emelkedést mutattak a kontroll értékekhez viszonyítva, egyértelműen alátámasztva a petefészekben jelenlevő gyulladást. A TAK-448/MVT-602 kezelés következtében mindhárom paraméter szintje nagymértékben csökkent a PCOS-es állatokhoz viszonyítva.



**10. ábra:** Petefészek IL-1 $\beta$  koncentrációja

(IL-1 $\beta$ ; pg/mg fehérjeként kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5-6$ , \* $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között, # $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.

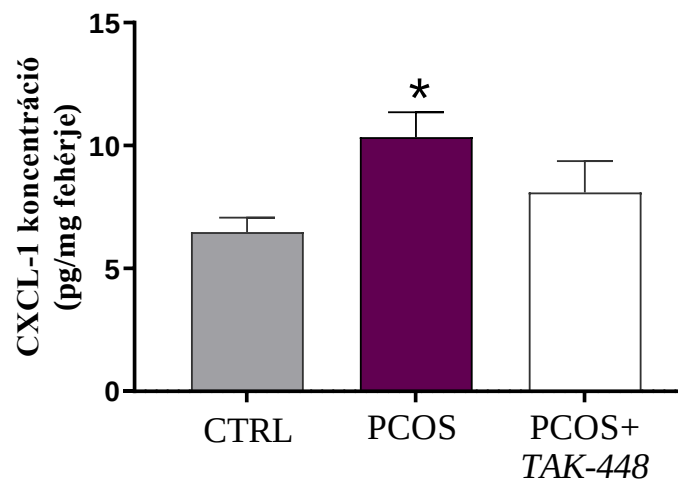
CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, IL-1 $\beta$ = interleukin-1 $\beta$ .



**11. ábra:** Petefészek IL-12p70 koncentrációja

(IL-12p70; pg/mg fehérjeként kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5-7$ , \* $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között, # $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.

CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, IL-12p70= interleukin-12 p70 heterodimer.



**12. ábra:** Petefészek CXCL-1 koncentrációja

(CXCL-1; pg/mg fehérjeként kifejezve) Átlag:  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5-6$ , \* $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a CTRL és DHEA-kezelt patkányok között, # $p < 0,05$ : Statisztikai szignifikancia a DHEA-nal kezelt és a DHEA+TAK-448/MVT-602-vel kezelt patkányok között.

CTRL= kontroll, DHEA = dehidroepiandroszteron, PCOS= policisztás ovárium szindróma, CXCL-1= C-X-C motívumú kemokin ligandum 1.

## 7. Diskusszió

A PCOS-t az egyik leggyakoribb krónikus endokrin-metabolikus rendellenességként tartják számon, amely a reprodukzív korú nők 8-13%-át érinti. A felborult hormonális egyensúly, a szabálytalan menstruáció, valamint a peteérés hiánya megnehezítheti a teherbeesést, ezért a PCOS a meddőség egyik vezető okának tekinthető [5]. A betegség incidenciájában és progressziójában a hormonális egyensúlyzavar mellett a gyulladásos folyamatok is kiemelt fontossággal bírnak, amelyek szoros összefüggésbe hozhatók az oxidatív stresszel. Kísérletünk során igazoltuk a PCOS-t kísérő hormonális változásokat, továbbá a petefészek szövetet érintő gyulladásos és oxidatív stresszel társítható paraméterek szintjének fokozódását. Mindezek alapján a gyulladásos és oxidatív/nitrozatív stressz paraméterei kiemelt terápiás célpontnak tekinthetők. Az eredmények alapján a TAK-448/MVT-602 terápia sikeresen mérsékelte a PCOS-re jellemző elváltozásokat, az oxidatív stresszt és gyulladásos markereket, ezzel utalva a PCOS terápia pozitív hatásaira.

A PCOS háttérfolyamatának, valamint a terápiás célparaméterek és folyamatok vizsgálatára elengedhetetlen a megfelelő állatmodell kiválasztása [61]. A PCOS vizsgálatára számos rágszálómodell létezik, amelyek közül elkülöníthetünk transzgenikus, illetve kémiai indukált modelleket. A modellek lehetőséget nyújtanak a PCOS kórfolyamatainak vizsgálatára, továbbá a metabolikus betegség és a petefészek diszfunkció közötti kapcsolat specifikus vizsgálatára. A transzgenikus rágszálómodellek, mint például a Koletsky és Zucker Diabetic Fatty (ZDF) patkányok [62, 63], mind a PCOS-hez hasonló elhízással összefüggő metabolikus és reprodukzív diszfunkciókat mutatnak. A ZDF patkányok emellett cikluszavarokat és petefészek diszregulációkat mutatnak, így jelentős szerepet játszanak a női reprodukzív rendellenességek kutatásában [63]. A PCOS kialakulására azonban nemcsak genetikai, hanem kémiai indukált/hormonális modellek is léteznek, amelyek társíthatók a hiperandrogéniával, vagyis a megemelkedett androgénszintek koncentrációjában történő változással, amely a PCOS egyik fő jellemzője. Mindezek alapján a szteroid hormonok és modulátoraik alkalmazása a legelterjedtebb módszer a PCOS tüneteinek kísérletes előidézésére [61, 64, 65]. A kutatások szerint a korai életkorban a túlzott androgéntermelésnek való kitettség felnőttkorban PCOS-hez vezethet. Ennek vizsgálatára rágszálókban különböző androgéneket, mint például tesztoszteront (T),  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteront (DHT) és dehidroepiandrosteront (DHEA) használnak [66]. A DHEA egy androgén, amely elsősorban a mellékvesében termelődik, és a PCOS-ben szenvedő nők szervezetében magas szinten van jelen. A DHEA kezelés standard dózisa 6mg/100 g testtömeg/nap, aminek következtében a tisztás tüszők száma

növekszik, a granuláris sejtréteg elvékonyodik, míg a theca-sejtréteg megvastagodik [67, 68]. Emellett ezen állatok szérumban az LH/FSH arány, valamint a T szintje a kontroll csoporthoz képest magasabb szintet mutat [67, 69]. DHEA-indukált PCOS következtében a hipotalamuszban csökken Kiss1 transzkriptum szintje, amelynek következtében szabálytalan ciklusok figyelhetők meg [69]. Mindezek alapján, jelen kísérletünkhöz is a DHEA-indukált PCOS modellt hoztunk létre fertilis korú nőstény patkányokon. Zhang és munkatársai [70] egy 2023-ban készült kutatásukban szintén a DHEA-t használták, hogy megvizsgálják az AMH emelkedés lehetséges mechanizmusát Sprague-Dawley patkány petefészek szövetben. Ennek érdekében 6 mg/100 g DHEA-t adtak 20 napon keresztül az állatoknak, aminek eredményeként a petefészek follikulusai jelentősen megnöttek, valamint a T és az AMH szintje is szignifikáns emelkedést mutatott. Szintén DHEA-t használva Selenay és munkatársai [71] Wistar patkányoknál váltottak ki PCOS-t. Megfigyeléseik során kimutatták, hogy az LH szint, valamint az LH/FSH arány is szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoportokhoz képest. Ez összhangban áll eredményeinkkel, ugyanis megfigyeltük, hogy a PCOS csoportban az LH szint jelentősen növekedett, míg az FSH szint csökkenést mutatott, ami az LH/FSH arány egyensúlyának eltolódását eredményezte. Egészséges nőknél a GnRH felszabadulást a hipotalamusz pulzáló módon választja ki, amely az agyalapi mirigyet a gonadotropinok, azaz az LH és az FSH felszabadítására serkenti [72]. Ezzel szemben PCOS-ben szenvedő nőknél a megnövekedett GnRH szint következtében emelkedett LH szint tapasztalható, ami az LH/FSH arány jelentős növekedését eredményezi [73]. Ennek a felborulásnak az eredményeként fokozott LH-stimuláció jöhet létre, ami miatt hiperplázián mennek keresztül a theca-sejtek, és emiatt a tüszőfolyadék felhalmozódik és kialakulnak a ciszták a petefészekben [72]. A gonadotropinok egyensúlyának eltolódását számos humán klinikai vizsgálatban is megfigyelték. A Janssen és munkatársai [74] által végzett klinikai kísérletbe 343 PCOS-es beteget vontak be, és Jyoshna és társaihoz hasonlóan vizsgálati eredményeik nagyobb LH/FSH arányt, megnövekedett tesztoszteronszintet mutattak ki PCOS-ben szenvedő nőknél [75].

Ahogy az LH/FSH is megváltozott a PCOS-ben, úgy a tesztoszteron szintjénél is kóros állapotokat figyeltünk meg. A DHEA hatására ugyanis szignifikánsan emelkedett szérumban tesztoszteron szintet detektáltunk a PCOS csoportban. A hiperandrogenizmus biokémiai szempontból a tesztoszteron magas szintjével társul, ami jelentős hatással van az endokrin rendszerre. A tesztoszteron két fő formában van jelen a vérben: kötött és szabad formában. Kötött állapotban főleg a nemi hormonokat megkötő globulinhoz (SHBG) és kisebb mértékben az albuminhoz kapcsolódik [72]. Fiziológiás állapotban a tesztoszteron 80 %-a SHBG-hez kötve található, míg körülbelül 19 %-a albuminhoz kapcsolódik, és mindössze 1 %-a van

szabadon, amely közvetlenül képes kötődni a receptorokhoz és kifejteni hormonális hatását [76, 77]. A gonadotropin szintézis korai szakaszában a túlzott androgének a primordiális tüszők növekedését és számuk emelkedését indukálják [78].

Alhassan és munkatársai [79] kutatásában 300 PCOS-ben szenvedő nőt vontak be, a résztvevők több mint kétharmadánál emelkedett LH/FSH arányt, és több mint a felénél megnövekedett tesztoszteron szintet mértek. Tehát a résztvevő PCOS-ben szenvedő nőknél a szérum LH-FSH arány és a T szoros kapcsolatban áll egymással, ezzel alátámasztva eredményeinket.

Az LH, az FSH és más reprodukzív hormonok egyensúlyzavara negatívan befolyásolhatja a petefészek működését, elősegítve a gyulladásos folyamatok kialakulását, valamint az oxidáns/antioxidáns egyensúly felborulását [80]. Az ovulációt megelőzően az LH fokozott szekréciója gyulladásos mediátorok felszabadulását indukálja a petefészekben, ami a ROS túltermeléséhez vezet [81]. A megemelkedett ROS-szintek kulestényezőként szerepelnek az ovulációs folyamat számos lényeges aspektusában, beleértve a cumulus sejtek expanszióját, a progeszteron szintézisét, a preovulációs gének expresszióját és az ovuláció kiváltásához szükséges jelek aktiválását [82]. Ezen folyamatok révén az oxidatív stressz, hasonlóan a gonadotropinok emelkedéséhez, központi szerepet tölt be a PCOS patofiziológiájában [83, 84]. A PCOS szoros összefüggésben áll a mitokondriális diszfunkcióval, amely fokozott ROS-termelést és oxidatív stresszt eredményez, ugyanis a ROS-ok főként a mitokondriális elektrontranszportlánc aktivitása során keletkeznek [85]. Ez a túlzott ROS-termelés hozzájárul az oxidatív stressz kialakulásához a petefészekszövetekben [86]. A ROS-ok kettős szerepet játszanak, egyszerre működnek jótékony jelzőmolekulaként és potenciálisan káros oxidatív elemként is. Egészséges állapotban a ROS-termelődést a szervezet antioxidáns védelmi rendszerei egyensúlyban tartják. Ez az egyensúly döntő fontosságú, azonban egyes PCOS-ben szenvedő nőknél az antioxidáns védelmi mechanizmusok csökkenése tapasztalható, ami a ROS-termelés és az antioxidáns védelem közötti egyensúly felborulásához vezet [87, 88]. Méréseink a ROS koncentráció szignifikáns növekedését igazolták a DHEA-val kezelt állatok petefészekszövetében, melyhez hasonlóan Ruxia és társai [89] friss kutatásukban szintén megfigyeltek. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a tüszőfolyadékban lévő ROS felhalmozódás befolyásolhatja a petesejtek minőségét, ami rendellenes ovulációhoz és meddőséghez vezethet [90, 91].

A ROS mellett a reaktív nitrogénfajok (RNS) is fontos szerepet játszanak a sejtfiziológiában, hiszen részt vesznek a jelátviteli útvonalakban és immunválaszokban [92]. A ROS, valamint a RNS károsíthatják a sejteket, ezáltal megzavarják a redox egyensúlyt [93]. A

nitrogén-monoxid (NO) és annak metabolitjai kis mennyiségben védő hatásúak, de nagy koncentrációban apoptózist idézhetnek elő [94, 95]. A nitroztatív stressz mérésére a 3-Nitrotirozin (3-NT) szintjének meghatározása egy elfogadott módszer. A 3-NT képződése során a fehérjékben lévő tirozin-maradványokat peroxinitrit nitrálja, ami emelkedett RNS-szintet jelez [96]. Eredményeink egyértelműen alátámasztották a felvetésünk, miszerint PCOS-ben a nitroztatív stressz szintje is jelentősen megnövekedik, ugyanis a 3-NT szintje a kontroll állatokhoz képest szignifikáns növekedést mutatott. Ezzel összhangban publikáltak eredményeket Masszi és munkatársai [97], akik DHT-kezelt PCOS patkánymodellben a keringő leukocitákban és a petefészekben mért 3-NT szintje szignifikáns növekedést mutatott.

Az oxidatív/nitroztatív stressz mellett a PCOS állapot a gyulladásos folyamatokkal is társítható [85]. A PCOS kórállapotban a megnövekedett oxidatív stressz és az aktivált NF- $\kappa$ B szintek a krónikus alacsony fokú gyulladás állapotát eredményezik, ami elősegíti a különböző gyulladásos molekulák, köztük az interleukinok expresszióját [56]. A gyulladás legjelentősebb közvetítőjének tekinthetők az interleukinok, ezért kísérletünk során ezek egyes tagjainak változásaira fókuszáltunk: meghatároztuk az IL-1 $\beta$  és IL-12p70 termelődését DHEA hatására [98-100]. Az IL-1 $\beta$ , egy erős proinflammatorikus citokin, amely központi szerepet játszik a gyulladásos válaszban [98]. Főként monociták és makrofágok termelik, és többféle gyulladásos molekula, például az IL-6 és IL-12 valamint a CXCL-1 expresszióját szabályozza, ami fokozza a gyulladásos reakciókat és az immunválaszt [101-103]. Az IL-12p70, amely az IL-12 citokin egyik formája, döntően járul hozzá a T-helper 1 (Th1) típusú sejtek differenciálódásához, ezzel elősegítve a sejtközvetített immunválaszt [100]. A CXCL-1 kemokin szintén jelentős szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, mivel képes a neutrofilek toborzására és aktiválására, ezáltal fokozva a gyulladásos sejtek bevándorlását a sérülés helyére [103-106]. Ez a gyulladásos környezet azonban nemcsak a petefészek működését, hanem a teljes reprodukzív ciklust befolyásolja [98, 107]. Mindezek alapján kísérletünk során fontosnak tartottuk, hogy az oxidatív stressz mellett a gyulladásos faktorok szintjének a változását is monitorozzuk.

Vasyukova és munkatársai [108] 44 PCOS-ben szenvedő nőt vizsgáltak és számos interleukin szintjének a változását megmérték. Eredményeikkel egyértelműen igazolták, hogy az egészséges nőkhöz viszonyítva a PCOS-ben szenvedő nők szervezetében fokozott gyulladásos folyamatok indulnak el, amihez nagyszámú interleukin család járul hozzá.

Eredményeink tehát összhangban vannak a szakirodalomban eddig megtalálható leírt adatokkal, miszerint PCOS-ben szenvedők esetében a gyulladás mértéke növekszik.

Elemzéseink során ugyanis növekedést tapasztaltunk mind az IL-1 $\beta$ , IL-12p70, mind pedig a CXCL-1 koncentrációiban PCOS-es patkány petefészekben.

Ezek az eredmények összességében alátámasztják, hogy a gonadotropinok egyensúlyának felborulása, a fokozott oxidatív és nitroztatív stressz, valamint a gyulladásos faktorok emelkedett szintje mind hozzájárulnak a hormonális és anyagcserezavarokhoz. Ezek a tényezők egymást erősítve hozzák létre a PCOS jellemző tüneteit, és ezen tényezők célzott szabályozása potenciálisan hozzájárulhatna a PCOS-el járó tünetek enyhítéséhez. Kísérletünk során tehát ezen a kóros elváltozások kezelésére kerestük a megoldást.

Az utóbbi évek tanulmányai a neuropeptidek szerepét hangsúlyozzák a PCOS modellállatok hipotalamuszában [109, 110]. A kisspeptin és analógjainak szerepe ugyanis kulcsfontosságúvá vált a pulzáló GnRH felszabadulás szabályozásának kutatásában, különösen a női reprodukció területén [111]. A GnRH/LH szekréciója a nőknél pulzáló és lökésszerű formában történik, amely elősegíti a petefészek tüszők érését és hormontermelését [112].

Szakirodalmi adatok igazolják, hogy kisspeptin a HPG tengely fiziológiás szabályozásában fontos szerepet játszik [113, 114]. A PCOS kórfolyamatában betöltött funkciója még nem teljesen tisztázott, ugyanis mind humán, mind az állatmodellek vonatkozásában ellentmondásos cikkek születtek a kisspeptin szintjének változásairól PCOS betegségben. Brown és munkatársai [115] megállapították, hogy a DHT által kiváltott PCOS patkánymodellben csökkent a hipotalamikus KISS1 mRNS szintje és a kisspeptin immunreaktivitása. Emellett szintén leírták, hogy a KISS1 gén expressziója csökkent tesztoszteron-indukált patkánymodell esetében is [52]. Ezek a megfigyelések hozzájárulnak ahhoz a feltételezéshez, hogy az androgéntöbblet befolyásolja a hipotalamuszban a kisspeptin rendszer szabályozását, amely elengedhetetlen a reprodukciós hormonok egyensúlyához és a normál ovulációs ciklus fenntartásához.

A kisspeptin 10 (KP10) és kisspeptin 54 (KP54) natív aminosavak, melyeket a KISS1 gén szignalizál. A közelmúltban a KP10 módosításával KISS1 receptor (KISS1R) agonistákat fejlesztettek ki, hogy azok nagyobb hatásfokkal és stabilitással rendelkezzenek, és így a transzlációs úton keresztül előrébb vigyék a kisspeptinre irányuló terápiákat [116]. A TAK-448/MVT-602 egy olyan KISS1R agonista, amelyről kimutatták, hogy hatásosabb és hosszabb ideig indukálja a GnRH neuronális tüzelést, mint a natív KP54 (115 vs. 55 perc) [111, 116]. A TAK-448/MVT-602 és a KP54 összehasonlításában megmutatkozik, hogy mindkét KISS1R agonista ígéretes a reproduktív rendellenességek kezelésében, különösen az in vitro fertilizációs (IVF) terápiák esetében. A KP54 közvetlen stimulációval hat a hipotalamikus GnRH neuronokra, és az ovárium túlstimulációs szindróma (OHSS) kockázata nélkül segíti elő a

petesejtek érését [117], ezáltal elkerülve az OHSS gyakori szövődményeit [116]. A TAK-448/MVT-602 különleges előnye viszont, hogy a természetes ciklusközepe gonadotropin-hullámhoz hasonló hatást nyújt: nemcsak az LH, hanem az FSH szintjét is befolyásolja [118-121], így sokkal kiegyensúlyozottabb hormonális környezetet teremt [116]. Ez a komplex hatásmechanizmus segíthet a kezelés során a jobb klinikai eredmények elérésében, valamint az IVF és egyéb reprodukzív terápiák biztonságosabbá és hatékonyabbá tételében.

Jelenleg kevés szakirodalmi forrás áll rendelkezésünkre, amelyek a TAK-448/MVT-602 hatását vizsgálták PCOS állatmodellben, ezért célul tűztük ki a TAK-448/MVT-602 hatásának feltérképezését DHEA-kezelt PCOS patkánymodellben. A 25 napos kezelés során sikeresen indukáltuk a PCOS-t, majd a TAK-448/MVT-602 kezelés sikeresen javította a PCOS-t kísérő kóros elváltozásokat. Makroszkópos és mikroszkópos vizsgálataink alapján a KISS1R agonista TAK-448/MVT-602 jelentős hatással van a PCOS esetén kialakuló cisztás elváltozásokra, csökkentve azok számát és méretét, ami hozzájárul az ovárium morfológiájának javulásához. A cisztás petefészkekben gyakran észlelt, éretlen tüszők száma és mérete csökkent, ami a petefészek szerkezetének fokozatos visszarendeződését eredményezi az egészséges állapot felé. A kezelés hatékonyan szabályozza az LH és FSH termelését, így elősegíti a hormonális egyensúly helyreállítását. Ezáltal támogatja az érett tüszők fejlődését, miközben mérsékeli a cisztás képződmények kialakulását. Az androgén túlsúlyt is csökkenti, amit a szérum tesztoszteronszint kontroll értékekre történő csökkenése mutat.

Vizsgálataink alátámasztották, hogy a hormonális egyensúly felborulásának mérséklése mellett, a TAK-448/MVT-602 kezelés a petefészek ROS és 3-NT szintjét is szignifikánsan csökkentette, ezáltal javítva a petefészek szövetre jellemző antioxidáns/oxidáns egyensúlyt, illetve az oxidatív és nitrozatív stressz csökkenését. Ezek a molekuláris szintű változások fontos szerepet játszanak a PCOS okozta sejtkárosodás csökkentésében és a petefészek egészséges morfológiájának fenntartásában [85].

A TAK-448/MVT-602 kezelés hatására a petefészekben nemcsak az oxidatív és nitrozatív stressz mutatott csökkenést, hanem jelentősen csökkentek a gyulladásos faktorok szintjei is, beleértve az IL-12p70, IL-1 $\beta$  és CXCL-1 molekulákat. Ezek a gyulladásos mediátorok a PCOS súlyosbodásához és a tüszők károsodásához járulnak hozzá, így alacsonyabb szintjük elősegíti a gyulladásos válasz mérséklését és a petefészek mikrokörnyezetének helyreállítását [40]. Az IL-6 és IL-1 $\beta$  szerepet játszanak a krónikus gyulladás fenntartásában, míg a CXCL-1 kemokinként hozzájárul a gyulladásos sejtek toborzásához [98-100]. A TAK-448/MVT-602 kezelés ezen faktorok gátlásával hatékonyan csökkenti a gyulladásos folyamatokat, ami hozzájárul a petefészek egészségesebb

szerkezetének fenntartásához és a normális tüszőfejlődés elősegítéséhez, melyet makroszkóposan és mikroszkóposan is sikerült megfigyelnünk.

Jelenlegi tudásunk szerint kutatócsoportunknak elsőként sikerült igazolnia a KISS1R agonista TAK-448/MVT-602 kedvező hatását a PCOS-t kísérő gyulladásos és oxidatív/nitrozatív stressz csökkentésében. Eredményeink alátámasztják, hogy a TAK-448/MVT-602 kezelés képes elősegíteni a hormonális egyensúly helyreállítását, mérsékelni a petefészek morfológiai elváltozásait, csökkenteni az oxidatív és nitrozatív stresszt, valamint szabályozni a gyulladásos faktorok szintjét is. Ezek az eredmények nemcsak a PCOS patofiziológiájának mélyebb megértését támogatják, hanem egy új terápiás irányt is jelentenek, amely a PCOS-ben szenvedő betegek életminőségének javítását célozza. A TAK-448/MVT-602 alkalmazásával kapcsolatos további kutatások új lehetőségeket nyithatnak meg a betegség célzottabb és hatékonyabb kezelése érdekében, kiemelve ennek a kezelésnek a fontosságát a reprodukív egészség területén.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Varga Csaba** tanszékvezetőnek, hogy lehetőséget teremtett számomra a Biológia Intézet Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén végzett munkámhoz. Hálával tartozom témavezetőimnek, **Dr. Szabó Renátának** és **Dr. Matvon Denisenek**, akik végig türelmesen, az elvárásokat felülmúlóan kiváló szakmai tudásukkal segítették TDK dolgozatom létrejöttét. Ugyanakkor köszönetemet szeretném kifejezni Sótiné Dr. Bagyánszki Máriának, Dr. Bódi Nikolettnek és Barta Bencének a szövettani vizsgálatokban nyújtott segítségükért, valamint Dr. Szebeni Gábornak és Dr. Neuperger Patrícának a LegendPlex mérésekben végzett munkájukért.

Köszönöm továbbá a családomnak és a barátaimnak, hogy támogatnak a tanulmányaim során, valamint 408-as labor munkatársainak, hogy a támogató közeget és jókedvet teremtettek a mindennapokban.

A TDK dolgozat kutatási témája a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal, **OTKA** Posztdoktori kiválósági programhoz (OTKA PD 143242, Szabó Renáta) kapcsolódik.

## 9. Irodalomjegyzék

1. WHO. *1 in 6 people globally affected by infertility*: WHO. 2023; Available from: <https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>.
2. Zegers-Hochschild, F., et al., *The international glossary on infertility and fertility care*, 2017. Human reproduction, 2017. **32**(9): p. 1786-1801.
3. Hart, R.J., *Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics*. Physiological reviews, 2016. **96**(3): p. 873-909.
4. Vander Borgh, M. and C. Wyns, *Fertility and infertility: Definition and epidemiology*. Clinical biochemistry, 2018. **62**: p. 2-10.
5. WHO. *Polycystic ovary syndrome*. 2023; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/polycystic-ovary-syndrome>.
6. Nandi, A., et al., *Polycystic ovary syndrome*. Endocrinology and Metabolism Clinics, 2014. **43**(1): p. 123-147.
7. Rotterdam, E., *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 19-25.
8. Norman, R.J., et al., *Polycystic ovary syndrome*. The Lancet, 2007. **370**(9588): p. 685-697.
9. Christ, J.P. and M.I. Cedars, *Current guidelines for diagnosing PCOS*. Diagnostics, 2023. **13**(6): p. 1113.
10. Patel, S., *Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2018. **182**: p. 27-36.
11. Ye, W., et al., *The role of androgen and its related signals in PCOS*. Journal of cellular and molecular medicine, 2021. **25**(4): p. 1825-1837.
12. Paixão, L., et al., *Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2017. **15**: p. 1-11.
13. Lewis, V., *Reproductive Endocrinology and Infertility*. 2024: CRC Press.
14. Meier, R.K., *Polycystic ovary syndrome*. Nursing Clinics, 2018. **53**(3): p. 407-420.
15. Mara Spritzer, P., C. Rocha Barone, and F. Bazanella de Oliveira, *Hirsutism in polycystic ovary syndrome: pathophysiology and management*. Current pharmaceutical design, 2016. **22**(36): p. 5603-5613.
16. Azziz, R., *Polycystic ovary syndrome*. Obstetrics & Gynecology, 2018. **132**(2): p. 321-336.
17. Rababa'h, A.M., B.R. Matani, and A. Yehya, *An update of polycystic ovary syndrome: causes and therapeutics options*. Heliyon, 2022. **8**(10).
18. Sirmans, S.M., et al., *Epidemiology and comorbidities of polycystic ovary syndrome in an indigent population*. Journal of Investigative Medicine, 2014. **62**(6): p. 868-874.
19. Kircik, L.H., *Advances in the Understanding of the Pathogenesis of Inflammatory Acne*. Journal of Drugs in Dermatology: JDD, 2016. **15**(1 Suppl 1): p. s7-10.
20. Diamanti-Kandarakis, E., *Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications*. Expert Reviews in molecular medicine, 2008. **10**: p. e3.
21. Zeng, X., et al., *Polycystic ovarian syndrome: Correlation between hyperandrogenism, insulin resistance and obesity*. Clinica chimica acta, 2020. **502**: p. 214-221.
22. Norman, R.J., et al., *The role of lifestyle modification in polycystic ovary syndrome*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2002. **13**(6): p. 251-257.
23. Diamanti-Kandarakis, E., C. Christakou, and E. Marinakis, *Phenotypes and enviromental factors: their influence in PCOS*. Current pharmaceutical design, 2012. **18**(3): p. 270-282.
24. Arentz, S., et al., *Herbal medicine for the management of polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated oligo/amenorrhoea and hyperandrogenism; a review of the laboratory evidence for effects with corroborative clinical findings*. BMC complementary and alternative medicine, 2014. **14**: p. 1-19.
25. Limonta, P., et al., *GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies*. Endocrine reviews, 2012. **33**(5): p. 784-811.

26. Clarke, H., W.S. Dhillon, and C.N. Jayasena, *Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders*. Endocrinology and Metabolism, 2015. **30**(2): p. 124-141.
27. Kumar, P. and S.F. Sait, *Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction*. Journal of human reproductive sciences, 2011. **4**(1): p. 2-7.
28. El Sayed, S.A., M.W. Fahmy, and J. Schwartz, *Physiology, pituitary gland*. 2017.
29. Reame, N., et al., *Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1984. **59**(2): p. 328-337.
30. Arao, Y., et al., *Dysregulation of hypothalamic-pituitary estrogen receptor  $\alpha$ -mediated signaling causes episodic LH secretion and cystic ovary*.
31. Ilahi, S. and T.B. Ilahi, *Anatomy, adenohypophysis (pars anterior, anterior pituitary)*. 2018.
32. Barbieri, R.L., *The endocrinology of the menstrual cycle*. Human fertility: methods and protocols, 2014: p. 145-169.
33. Walters, K. and D. Handelsman, *Role of androgens in the ovary*. Molecular and cellular endocrinology, 2018. **465**: p. 36-47.
34. Rosenfield, R.L. and D.A. Ehrmann, *The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited*. Endocrine reviews, 2016. **37**(5): p. 467-520.
35. Burger, H.G., *Androgen production in women*. Fertility and sterility, 2002. **77**: p. 3-5.
36. Tsutsumi, R. and N.J. Webster, *GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction*. Endocrine journal, 2009. **56**(6): p. 729-737.
37. Aparicio, S.A., *Kisspeptins and GPR54—The new biology of the mammalian GnRH axis*. Cell metabolism, 2005. **1**(5): p. 293-296.
38. Taylor, A.E., et al., *Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome*. The journal of clinical endocrinology & metabolism, 1997. **82**(7): p. 2248-2256.
39. Singh, C.O.C.G. *Physiology, Gonadotropin-Releasing Hormone*. 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558992/>.
40. Lőrincz, C.E., et al., *Mechanisms and Target Parameters in Relation to Polycystic Ovary Syndrome and Physical Exercise: Focus on the Master Triad of Hormonal Changes, Oxidative Stress, and Inflammation*. Biomedicines, 2024. **12**(3): p. 560.
41. Liao, B., J. Qiao, and Y. Pang, *Central regulation of PCOS: abnormal neuronal-reproductive-metabolic circuits in PCOS pathophysiology*. Frontiers in endocrinology, 2021. **12**: p. 667422.
42. Gilling-Smith, C., et al., *Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994. **79**(4): p. 1158-1165.
43. Mohammadi, M., *Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review*. International journal of preventive medicine, 2019. **10**(1): p. 86.
44. Murri, M., et al., *Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis*. Human reproduction update, 2013. **19**(3): p. 268-288.
45. Seaver, L.C. and J.A. Imlay, *Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide?* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(47): p. 48742-48750.
46. Allen, R. and M. Tresini, *Oxidative stress and gene regulation*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **28**(3): p. 463-499.
47. Dröge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological reviews, 2002.
48. Herrera, E. and C. Barbas, *Vitamin E: action, metabolism and perspectives*. Journal of physiology and biochemistry, 2001. **57**: p. 43-56.
49. Johnson, L.J., S.L. Meacham, and L.J. Kruskall, *The antioxidants-vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Journal of agromedicine, 2003. **9**(1): p. 65-82.
50. Al-Gubory, K.H., P.A. Fowler, and C. Garrel, *The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2010. **42**(10): p. 1634-1650.

51. Chaudhari, N., M. Dawalbhakta, and L. Nampoothiri, *GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2018. **16**: p. 1-13.
52. Tang, R., X. Ding, and J. Zhu, *Kisspeptin and polycystic ovary syndrome*. Frontiers in endocrinology, 2019. **10**: p. 298.
53. Gubbels Bupp, M.R. and T.N. Jorgensen, *Androgen-induced immunosuppression*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 370132.
54. Hu, C., et al., *Immunophenotypic profiles in polycystic ovary syndrome*. Mediators of Inflammation, 2020. **2020**(1): p. 5894768.
55. Figueroa, F., et al., *Role of macrophage secretions on rat polycystic ovary: its effect on apoptosis*. Reproduction, 2015. **150**(5): p. 437-448.
56. Shabbir, S., et al., *The interplay between androgens and the immune response in polycystic ovary syndrome*. Journal of Translational Medicine, 2023. **21**(1): p. 259.
57. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Frontiers in immunology, 2014. **5**: p. 508.
58. Ajayi, A.F. and R.E. Akhigbe, *Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update*. Fertility research and practice, 2020. **6**: p. 1-15.
59. Auta, T. and A. Hassan, *Alteration in oestrus cycle and implantation in Mus musculus administered aqueous wood ash extract of Azadirachta indica (neem)*. Asian Pacific Journal of Reproduction, 2016. **5**(3): p. 188-192.
60. McLean, A.C., et al., *Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification*. Journal of visualized experiments: JoVE, 2012(67).
61. Noroozzadeh, M., et al., *Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review*. Life sciences, 2017. **191**: p. 259-272.
62. Huang-Doran, I. and S. Franks, *Genetic rodent models of obesity-associated ovarian dysfunction and subfertility: insights into polycystic ovary syndrome*. Frontiers in endocrinology, 2016. **7**: p. 53.
63. Stener-Victorin, E., *Update on animal models of polycystic ovary syndrome*. Endocrinology, 2022. **163**(12): p. bqac164.
64. Shi, D. and D.F. Vine, *Animal models of polycystic ovary syndrome: a focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk*. Fertility and sterility, 2012. **98**(1): p. 185-193. e2.
65. Abbott, D.H., et al., *Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome*. Molecular and cellular endocrinology, 2013. **373**(1-2): p. 21-28.
66. Osuka, S., et al., *Animal models of polycystic ovary syndrome: A review of hormone-induced rodent models focused on hypothalamus-pituitary-ovary axis and neuropeptides*. Reproductive medicine and biology, 2019. **18**(2): p. 151-160.
67. Wang, D., et al., *DHEA-induced ovarian hyperfibrosis is mediated by TGF- $\beta$  signaling pathway*. Journal of ovarian research, 2018. **11**: p. 1-11.
68. Jang, M., et al., *Oriental medicine Kyung-Ok-Ko prevents and alleviates dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovarian syndrome in rats*. PloS one, 2014. **9**(2): p. e87623.
69. Iwasa, T., et al., *Effects of chronic DHEA treatment on central and peripheral reproductive parameters, the onset of vaginal opening and the estrous cycle in female rats*. Gynecological Endocrinology, 2016. **32**(9): p. 752-755.
70. Zhang, Y., X. Yu, and J. Zheng, *Mechanisms of DHEA-induced AMH increase in the ovarian tissues of PCOS rat*. Reproductive Biology, 2023. **23**(4): p. 100797.
71. Furat Rencber, S., et al., *Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study*. Journal of ovarian research, 2018. **11**: p. 1-16.
72. Ashraf, S., et al., *Hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome and role of CYP gene variants: a review*. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 2019. **20**(1): p. 1-10.
73. Walters, K.A., et al., *New perspectives on the pathogenesis of PCOS: neuroendocrine origins*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2018. **29**(12): p. 841-852.

74. Janssen, O.E., et al., *High prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome*. European journal of endocrinology, 2004. **150**(3): p. 363-369.
75. Dr. P. Jyoshna, D.A.P.V., Dr C Gayathri, *Hormonal Profile in PCOD patients: A Case-Control Study at a Tertiary Care Center*. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS), 2023. e-ISSN: 2279-0853, p-ISSN: 2279-0861. **Volume 22, Issue 2 Ser.3 (February. 2023), PP 49-54.**
76. Parker Jr, C.R., et al., *Effects of aging on adrenal function in the human: responsiveness and sensitivity of adrenal androgens and cortisol to adrenocorticotropin in premenopausal and postmenopausal women*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(1): p. 48-54.
77. Chen, M.-J., et al., *Low sex hormone-binding globulin is associated with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome in women with PCOS*. Human Reproduction, 2006. **21**(9): p. 2266-2271.
78. Bulsara, J., et al., *A review: Brief insight into Polycystic Ovarian syndrome*. Endocrine and metabolic science, 2021. **3**: p. 100085.
79. Alhassan, S.M., et al., *Testosterone level correlates significantly with luteinizing hormone to follicle-stimulating hormone ratio among women with polycystic ovary syndrome: A cross sectional study*. F1000Research, 2022. **11**: p. 152.
80. Ramya, S., et al., *Role of hormones and the potential impact of multiple stresses on infertility*. Stresses, 2023. **3**(2): p. 454-474.
81. Kicińska, A.M., et al., *Immunological and metabolic causes of infertility in polycystic ovary syndrome*. Biomedicines, 2023. **11**(6): p. 1567.
82. Yan, F., et al., *The role of oxidative stress in ovarian aging: a review*. Journal of ovarian research, 2022. **15**(1): p. 100.
83. Christodoulakos, G., et al., *Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'*. The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care, 2007. **12**(3): p. 194-202.
84. Agarwal, A., et al., *The effects of oxidative stress on female reproduction: a review*. Reproductive biology and endocrinology, 2012. **10**: p. 1-31.
85. Zeber-Lubecka, N., M. Ciebia, and E.E. Hennig, *Polycystic ovary syndrome and oxidative stress—from bench to bedside*. International journal of molecular sciences, 2023. **24**(18): p. 14126.
86. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochemical journal, 2009. **417**(1): p. 1-13.
87. Gao, Y., et al., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of granulosa cells in polycystic ovarian syndrome*. Frontiers in Medicine, 2023. **10**: p. 1193749.
88. Sulaiman, M.A., et al., *Polycystic ovarian syndrome is linked to increased oxidative stress in Omani women*. International journal of women's health, 2018: p. 763-771.
89. Liu, R., et al., *Clomiphene and dexamethasone inhibit apoptosis and autophagy via the ROS-JNK/MAPK-P21 signaling pathway in PCOS*. Histology and histopathology: p. 18800.
90. Yalçinkaya, E., et al., *Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes*. Journal of the Turkish German Gynecological Association, 2013. **14**(3): p. 136.
91. Nuñez-Calonge, R., et al., *Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors*. Reproductive biomedicine online, 2016. **32**(4): p. 446-456.
92. Alp, N.J. and K.M. Channon, *Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(3): p. 413-420.
93. Lancaster, J.R., *Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions*. Chemical research in toxicology, 2006. **19**(9): p. 1160-1174.
94. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?* Hypertension, 2004. **44**(3): p. 248-252.

95. Griending, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1912-1916.
96. Bandoowala, M. and P. Sengupta, *3-Nitrotyrosine: a versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases*. International Journal of Neuroscience, 2020. **130**(10): p. 1047-1062.
97. Masszi, G., et al., *Endothelial relaxation mechanisms and nitrative stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome*. Life sciences, 2013. **93**(4): p. 133-138.
98. Mu, Y., et al., *Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) promoter C [- 511] T polymorphism but not C [+ 3953] T polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome*. Endocrine, 2010. **37**: p. 71-75.
99. Rostamtabar, M., et al., *Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome*. Journal of cellular physiology, 2021. **236**(2): p. 824-838.
100. Hamza, T., J.B. Barnett, and B. Li, *Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications*. International journal of molecular sciences, 2010. **11**(3): p. 789-806.
101. He, X., et al., *Relationship between interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2002. **82**(10): p. 685-688.
102. Zhang, D., et al., *Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer*. BMC cancer, 2007. **7**: p. 1-7.
103. Boro, M. and K.N. Balaji, *CXCL1 and CXCL2 regulate NLRP3 inflammasome activation via G-protein-coupled receptor CXCR2*. The Journal of Immunology, 2017. **199**(5): p. 1660-1671.
104. Brown, H.J., et al., *Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2*. Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **18**(6): p. 1732-1739.
105. Cai, S., et al., *CXCL1 regulates pulmonary host defense to Klebsiella infection via CXCL2, CXCL5, NF- $\kappa$ B, and MAPKs*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(10): p. 6214-6225.
106. De Filippo, K., et al., *Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2013. **121**(24): p. 4930-4937.
107. Hurwitz, A., et al., *Cytokine-mediated regulation of rat ovarian function: interleukin-1 stimulates the accumulation of a 92-kilodalton gelatinase*. Endocrinology, 1993. **132**(6): p. 2709-2714.
108. Vasyukova, E., et al., *Inflammatory and anti-inflammatory parameters in PCOS patients depending on body mass index: A case-control study*. Biomedicines, 2023. **11**(10): p. 2791.
109. Ahn, T., et al., *Prenatal testosterone excess decreases neurokinin 3 receptor immunoreactivity within the arcuate nucleus and y cell population*. Journal of neuroendocrinology, 2015. **27**(2): p. 100-110.
110. Moore, A.M., et al., *Enhancement of a robust arcuate GABAergic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in a model of polycystic ovarian syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(2): p. 596-601.
111. Hu, K.-L., et al., *Advances in clinical applications of kisspeptin-GnRH pathway in female reproduction*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2022. **20**(1): p. 81.
112. Okamura, H., et al., *Kisspeptin and GnRH pulse generation*. Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology, 2013: p. 297-323.
113. Navarro, V.M., et al., *Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse*. Journal of Neuroscience, 2009. **29**(38): p. 11859-11866.
114. Billings, H.J., et al., *Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep*. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3836-3846.
115. Brown, R.E., et al., *Hypothalamic kiss1 mRNA and kisspeptin immunoreactivity are reduced in a rat model of polycystic ovary syndrome (PCOS)*. Brain research, 2012. **1467**: p. 1-9.

116. Abbara, A., et al., *Kisspeptin receptor agonist has therapeutic potential for female reproductive disorders*. The Journal of clinical investigation, 2020. **130**(12): p. 6739-6753.
117. Abbara, A., et al., *A second dose of kisspeptin-54 improves oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome: a Phase 2 randomized controlled trial*. Human Reproduction, 2017. **32**(9): p. 1915-1924.
118. Jayasena, C.N., et al., *Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(8): p. 3667-3677.
119. Hoff, J.D., M.E. Quigley, and S.S. Yen, *Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1983. **57**(4): p. 792-796.
120. Stricker, R., et al., *Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT® analyzer*. 2006, De Gruyter.
121. Vuong, T.N.L., et al., *Gonadotropin-releasing hormone agonist trigger in oocyte donors co-treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist: a dose-finding study*. Fertility and sterility, 2016. **105**(2): p. 356-363.