

A nemi hormonok kardiovaszkuláris hatásai élettani és kóros körülmények között

MTA doktori értekezés



Dr. Várbíró Szabolcs PhD Med. Habil.

Egyetemi docens

Semmelweis Egyetem ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Háttér	9
1.1. A női nem védő hatása kardiovaszkuláris szempontból	10
1.2. Policisztás Ovarium Szindróma (PCOS)	12
1.3. Menopauza.....	14
2. Célkitűzések	17
2.1. Az érrendszer nemi különbségeinek vizsgálata normo- és hipertóniában	17
2.2. Kardiovaszkuláris veszélyeztetettség fertilis korban – vaszkuláris változások hiperandrogén modellekben	17
2.3. A menopauza és a hormonpótlás ér-hatásai	18
3. Módszerek	20
3.1 Alkalmazott állatmodellek	20
3.1.1. Állatmodellek az erek nemi különbségek vizsgálatára (1A és 1B).....	20
3.1.2. PCOS állatmodellek	21
3.1.3. Menopauza modellek (3 A, B)	24
3.1.3.5. A menopauza és hormonpótlás hatásainak vizsgálatára alkalmazott ér modellek	25
3.2. Felhasznált anyagok az egyes modellekben.....	26
3.2.1. Felhasznált anyagok az angiotenzin II hipertóniás modellekben.....	26
3.2.2. Felhasznált anyagok PCOS modellekben	26
3.2.3. Felhasznált anyagok a menopauza modellekben.....	27
3.3. Vizsgált érterületek és protokollok	28
3.3.1. Kísérleti protokoll coronaria arteriolákon (1A, 1B, 2B, 3A modellekben).....	28

3.3.2. Gracilis arteriolák nyomás angiometriás mérése (2A modellben)	33
3.3.3. Thoracalis aortaringek ex vivo farmakológiai reaktivitása (2A modellben).....	34
3.3.4. Arteria saphena - krónikus hormonhiány és hormonpótlás hatása az akut ösztadiol relaxációra (3A modellben).....	36
3.3.5. Vena saphena in vitro kontraktilitása (3A, 3B modellben)	36
3.4. Statisztikai analízis	37
4. Eredmények.....	38
4.1. Normotóniás állatok koszorúserein mért nemi különbségek (1A modell).....	38
4.1.1. Kiemelendő biológiai paraméter	38
4.1.2. Nemi különbségek a coronaria rezisztencia arteriola geometriában	38
4.1.3. Nemi különbségek a coronaria arteriolafal elaszticitásban	39
4.1.4. Nemi különbségek a coronaria arteriolák kontraktilitásában és endothel funkciójában	41
4.2. A hipertóniás adaptációs változások nemi különbségei koszorúsereken (1B modell)..	42
4.2.1. Biológiai paraméterek	42
4.2.2. Nemi különbségek hipertóniában a coronaria rezisztencia arteriola geometriában	43
4.2.3. Nemi különbségek az erek biomechanikájában	44
4.2.4. Nemi különbségek a hipertóniás erek kontraktilitásában.....	46
4.3. D-vitamin kezelés hatása hiperandrogén állapotban (2A modell)	49
4.3.1. Általános fiziológiai és laborparaméterek (2A modell)	49
4.3.2. Gracilis arteriola geometria (2A modell, a. gracilis).....	50
4.3.3. Gracilis arteriola elaszticitás	51
4.3.4. Gracilis arteriola farmakológiai reaktivitás	53
4.3.5. Aorta morfológia és farmakológiai reaktivitás (2A modell)	60
4.3.6. Érfali eNOS és COX ₂ expresszió változások aortában (szövetten)	67
4.3.7. Oxidatív-nitratív stressz változásai különböző szövetekben hiperandrogén állapotban és D-vitamin kezelés hatására.....	69

4.3.8. Vénás változások korai PCOS modellünkben (2A modell)	75
4.4. Második PCOS modellünk első metabolikus és vaszkuláris eredményei (2B modell)	88
4.4.1. Alap élettani paraméterek és hormonszintek	88
4.4.2. T-kezelés és VDD csökkenti a coronaria arteriolák inzulin-indukálta vazorelaxációját.....	91
4.4.3. A D-vitamin szabályozza az INZ-R és VDR-expressziót coronaria arteriola szövetben.....	92
4.5. Menopauza modellek eredményei (3A és 3B modell)	95
4.5.1. Intramuralis coronaria-változások hormonhiányban és hormonpótlás mellett (3A1 modell)	95
4.5.2. Akut ösztadiol hatás vizsgálata krónikus hormonhiányban arteria saphenán (3A1 modell)	99
4.5.3. Vena saphena vizsgálata normotóniában (3A2 modell).....	100
4.5.4. Vena saphena vizsgálata hipertóniában és hormonhiányos állapotban (3B modell)	103
5. Megbeszélés	108
5.1. Nemi különbségek coronaria arteriák érreaktivitásában normotóniában és hipertóniában.....	108
5.1.1. Nemi különbségek élettani viszonyok között.....	108
5.1.2. A hipertóniás adaptáció nemi különbségei.....	111
5.2. PCOS modellekben nyert eredményeink megbeszélése	116
5.2.1. Korai PCOS modellünkről (2A modell).....	116
5.2.2. Morfológiai és érbiomechanikai változások arteriolákon	117
5.2.3. Gracilis arteriolák farmakológiai reaktivitása	119
5.2.4. Aorta gyűrűk farmakológiai reaktivitása.....	121
5.2.5. Szexuáliszteroidok érhatásai és interakcióik	123
5.2.6. Az inzulinra adott érválaszok regionális különbségei.....	127

5.2.7. Oxidatív stressz PCOS modellben aortán	128
5.2.8. Nitratív stressz PCOS modellben aortán	130
5.2.9. Véna saphena adaptáció PCOS modellben	132
5.2.10. Második PCOS modellünk eredményeinek megbeszélése	134
5.3. Érhatások menopauza modellekben normo- és hipertóniában	138
5.3.1. Intramuralis coronaria arteriola változásai hormonhiányban és hormonpótlás mellett.....	138
5.3.2. Akut ösztradiol hatás vizsgálata krónikus hormonhiányban arteria saphenán.....	140
5.3.3. A vénás rendszer változásai menopauza modellben normotóniában	142
5.3.4. A vénás rendszer változásai menopauza modellben, hipertóniában	143
6. Összegzés, fontosabb eredmények, új megállapítások.....	148
6.1. Nemi különbségek koszorúsereken	148
6.2. Hiperandrogén modellek fontosabb következtetései.....	148
6.2.1. A cukor- és inzulin anyagcserére vonatkozó eredmények áttekintése	149
6.2.2. Első PCOS modellünk egyéb kiemelt eredményei	149
6.3. Menopauza – hormonpótlás érhatások	151
7. Irodalomjegyzék.....	153
8. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények jegyzéke.....	170
8.1. PhD értekezéshez kapcsolódó közlemények	170
8.2. MTA doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények	171
8.3. A disszertációban idézett saját közlemények a témában.....	173
8.4. Egyéb saját angol nyelvű közlemények listája.....	175
8.5. A tudományos aktivitás összefoglaló adatai (2019.08.01.):.....	177
Köszönetnyilvánítás	178

Rövidítések jegyzéke

[1,25(OH)₂D₃] - 1,25-dihidroxi-D₃ vitamin/kalcitriol

[24,25(OH)₂D₃] - 24,25-dihidroxi-D₃ vitamin

[25(OH)D₃] - 25-hidroxi-D₃ vitamin/kalcifediol

°C - Celsius fok

5-HT - 5-hidroxi-triptamin/ szerotonin

a. - arteria

ACA - Artéria cerebri anterior

ACE gátló - Angiotenzin konvertáz enzim gátló

ACh - Acetil-kolin

ANOVA - Analysis of Variance/ Varianciaanalízis

ATII - Angiotenzin II

ACE (gátló) - Angiotenzin-II konvertáz enzim (gátló)

BK - Bradikinin

Ca²⁺ - Calcium(II)-ion

CaCl₂ - Kalcium-klorid

cAMP - Ciklikus adenzin-monofoszfát

CK - Kreatin-kináz

CO₂ - Széndioxid

COX, COX₂ – Ciklooxigenáz enzim, Ciklooxigenáz 2 izoenzim

CV% - Variációs koefficiens

Cx43 - Connexin-43

D₃ - Kolekalciferol

DAB – Diaminobenzidin

DHT - Dihidrotesztoszteron

d_i - Belső átmérő

d_o - Külső átmérő

E, E₂ – ösztrogén, ösztradiol/ ösztrogén pótló kezelésben részesült állatcsoport

EDTA - Etilén-Diamin-N,N,N',N'-TetraEcetsav

EGTA - Etilén-Glikol-bisz(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-TetraEcetsav

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/Enzim-kapcsolt immunoszorbens vizsgálat

(e)NOS – (Endotheliális) NO-szintáz enzim

ESHRE - European Society of Human Reproduction and Embriology

FGF23 - Fibroblast growth factor 23/Fibroblaszt növekedési faktor 23

FMP – utolsó menstruációs ciklus

GNRH - Gonadotropinfelszabadító hormon

Hgmm - Higanymilliméter

HOMA IR – homeostatic modell assessment – inzulin rezisztencia (= vércukor*inzulin)/22,5)

HPK - Hormonpótló kezelés

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography/ Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

HUVEC –humán umbilikális véna endothel sejt kultúra (illetve innen származó sejt)

i.m. - Intramuszkuláris

i.p. - Intraperitonealis

IHC - Immunhisztokémia

IR, IRB – inzulin receptor, inzulin receptor béta

ISH – in situ hibridizáció

IUGR – méhen belüli növekedési elmaradás

K⁺ - Kálium(I)-ion

KCl - Kálium-klorid

LAD - Left Anterior Descendens/ Bal elülső leszálló coronaria artéria

LC-MS - Folyadékkromatográfiával kiegészített tömegspektrometria

L-NAME - L-N^G-nitro-arginin metil észter hidroklorid

Log - Logaritmus

MABP –artériás közpnyomás

mg - milligramm

MgCl₂ - Magnézium-klorid

MgSO₄ - Magnézium-szulfát

mM/L - Millimol/Liter

µm -Mikrométer

MS - Tömegspektrometria

N₂ - Nitrogén (gáz)

NA - Noradrenalin

NaCl - Nátrium-klorid

NADPH – nikotinamid adenin dinukeotid hidrogén foszfát

NAFLD – nem alkoholos zsírmáj

NaH₂PO₄ - Nátrium-dihidrogén-foszfát

NaHCO₃ - Nátrium-hidrogén-karbonát

NE/ IU/ U - Nemzetközi Egység

nKR - Normál Krebs-Ringer-oldat

nM/L - Nanomol/Liter

NO - Nitrogén-monoxid

NT – nitrotirozin

O₂ - Oxigén

OV – ovariektomizált (állatok)

PAR, PARP - Poli (ADP)-ribóz, PAR-polimeráz

PCO, PCOS - Policisztás Ovarium, Policisztás Ovarium Szindróma

PGE – prosztaglandin E

P_{IL} - Intraluminális nyomás

pO₂ - Parciális O₂-tenzió

PTH - Parathormon

RAS – renin angiotenzin rendszer

r_i - Belső sugár

r_o - Külső sugár

s.c. - Szubkután

SD-patkány - Sprague-Dawley-patkány

SEM - Standard Error of the Mean/ Közéérték közepes hibája

SHR – spontán hipertóniás patkánytörzs

T - Tesztoszteron

T. intima, T. media - Tunica intima, Tunica media

TA - Thoracalis aorta

TGF-α - transzformáló növekedési faktor alfa

TXA₂ - Tromboxán-A₂

T2DM – Kettes típusú cukorbetegség

U46619 - Tromboxán-A₂-receptor-agonista vegyület

UTP - Uridin-5'-trifoszfát

v. - véna

VDD, VDR - Vitamin-D Deficiens/ D-vitamin hiány(os), D-vitamin receptor

VSMC - Vascular Smooth Muscle Cell/ Vaszkuláris simaizomsejt

1. Háttér

Az emberi szervezet változásait, e változások dinamikáját a nemek és a nemek közti különbségek is befolyásolják vagy meghatározzák.

Jelen tanulmányom témája a női nem előrehaladó életszakaszokhoz kapcsolódó fiziológiás és kóros szív-érrendszeri jellegzetességeinek vizsgálata, protektív vaszkuláris hatások feltárása.

Régóta ismert, hogy a szív-érrendszer élettani működésében, a napjainkban népbetegségnek számító hipertónia kialakulásában, patomechanizmusában is léteznek nemi különbségek.

Ezen eltérések jellege, mibenléte napjainkban is intenzíven kutatott terület. A női nem egyes életszakaszaira jellemző tulajdonságait, betegségét, valamint természetes változását kívánom bemutatni a szív-érrendszerre fókuszálva – kezdve a nemek in utero kialakulásával létrejövő és születést követően megfigyelhető nemi különbségekkel, folytatva a reprodukzív korban leggyakrabban előforduló policisztás ovarium szindróma, végül a fogamzóképes időszakot lezáró menopauza szív-érrendszeri működésben kimutatható eltéréseivel. Általánosságban elmondható, hogy nőkben 7-10 évvel később jelennek meg a szív-érrendszeri betegségek. Feltételezhető, hogy az endogén ösztrogének expozíciója a termékeny életszakasz alatt késlelteti az ateroszklerózis megjelenését nőknél. Ennek ellenére, a kardiovaszkuláris halálozás mégis vezető helyen áll a 65 év feletti nők mortalitásában [1]. Alapvetően fertilis korban a nők védettek a szív-érrendszeri betegségekkel szemben, a férfiakhoz képest [1]. Azonban ebben a korosztályban is léteznek veszélyeztetett csoportok: anyagcsere- és cukorbetegségben, inzulin rezisztenciában, illetve a policisztás petefészek szindrómások között számíthatunk fokozott kockázatra [2-4]. Menopauzában a női nem védő hatása megszűnik, csökken az ösztrogénszint és emiatt a kardiovaszkuláris rizikó megemelkedik [5]. A különbségek megértéséhez először a fiziológiás szív-érrendszeri működés megismerését tűztük ki célként, majd ehhez kapcsolódóan a hipertónia kialakulásának, stabilizálódásának nemi különbségeit vizsgáltuk.

Élettani-állatkísérletes kutatásaink során a nők kardiovaszkuláris védettségének és speciális körülmények között kialakuló sérülékenységének részleteit tártuk fel. Az állatkísérletes modellek lehetővé tették finom mechanizmusok elemzését, melyek humán vizsgálatok keretében etikai szempontból nem kivitelezhetőek. Ugyanakkor klinikusként inspirált a folyamatok kezdő lépéseinek azonosítása, melyek ismerete egyúttal útmutatást adhat későbbi betegvizsgálatok, valamint – a folyamatok megértésével és a személyre szabott orvoslás

szemléletével – az adekvát, korai, célirányos, nemre és állapotra specifikus beavatkozások megtervezésére.

1.1. A női nem védő hatása kardiovaszkuláris szempontból

A genetikai nem kialakításáért a 23. kromoszómapár, a szex-kromoszómák (XX, XY) felelősek. XX kromoszómapár női genetikai nemet, XY kromoszómapár férfi genetikai nemet eredményez az Y-kromoszómán elhelyezkedő SRY-gén és annak terméke, a Testis determináló faktor/TDF jelenlétében. Az SRY-gén és a TDF hiánya által válik genetikailag meghatározottá a női nem intrauterin életkorban. A női nemi szervek kifejlődése már régebben ismert és leírt, összetett folyamat, melyet az SRY gén hiányán kívül egyéb mellett az anyai placenta és a magzati ovarium ösztrogén-termelése (Ösztron/E1, 17- β -ösztadiol/E2, Ösztriol/E3, Ösztetrol/E4) által létrejött magas ösztrogénszint is stimulál. A férfi nemre jellemző szervek, organikus tulajdonságok SRY-gén és TDF jelenlétében a testis szövetben jelenlévő Leydig-sejtek tesztoszteron (T) termelésével, a T és aktív metabolitjainak virilizáló hatása révén alakulnak ki.

A kardiovaszkuláris rendszert illetően a szív a cardiogén telepből, az érrendszer nagyerei az angioblastok egyesülésével (vasculogenesis), míg az érrendszer fennmaradó része a már kifejlődött erek bimbózásával (angiogenesis) alakul ki. Feltételezhető, hogy genetikai-epigenetikai tényezők, valamint környezeti hatások, exogén-endogén hormonhatások által alakulhatnak ki a nemi különbségek már intrauterin életkorban. Köldökszínór vérben folyadék kromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálatokkal mérve az ösztrogének (E1, E2, E3, E4) koncentrációiban nem mutatkozott szignifikáns különbség leány és fiú magzatok között [6]. Ugyanakkor számos állatkísérlet bizonyítja, hogy hím utódokban adott endogén – exogén szervezeti hatásokra szív-érrendszeri diszfunkció és felnőttkorban szív-érrendszeri betegségek alakulnak ki, míg felnőtt nőstények mindezek ellen relatív védettséget élveznek. Az ösztrogén az egyik kulcsfontosságú faktor, amely a felnőttkori kardiovaszkuláris kórképekben mutató nemi különbségek kialakulásához hozzájárul [7]. Az ösztrogén rendelkezik lassú, nukleáris – génexpressziót és transzkripciót befolyásoló –, valamint gyors, nem-nukleáris, membrán-asszociált ösztrogén-receptorok/ER által kifejtett hatásokkal. Az ösztrogének kardiovaszkuláris protektív hatásait főképp ER α receptoron keresztül fejtik ki. Endothel-sejtekben mind az ER α és ER β képes aktiválni az endotheliális NO-szintáz (eNOS), ER α és ER β megtalálható vaszkuláris simaizom sejtekben (VSMC) és szívmusculussejtekben. Az E2 fokozza a NO-termelést endothel-sejtekben, amely vazorelaxációt eredményez. Az öregedés

és ovariectomia esetében e vazorelaxáció károsodik és vazokonstriktorokra fokozódik a válaszkészség. Az E2 ER α -n keresztül fokozza az angiogenezist, véd a vaszkuláris sérülés és az endothelsejt sérülés ellen – ezáltal védi az ereket integritását –, valamint gátolja a VSMC-proliferációt. Emellett a lipid-profilra is kedvező hatással bír: csökkenti az LDL-, növeli a HDL-szintet, így véd az ateroszklerózis ellen [8]. Mindemellett korábbi humán és állatkísérletes tanulmányok leírják, hogy léteznek fiziológiai illetve morfológiai szív-érrendszeri nemi különbségek: az érhálózati tulajdonságokban, az erek méretében, azok szövettani szerkezetében, valamint számos funkcionális jellegzetességben [9-12]. Továbbá lehetséges a szívfejlődés nemfüggő regulációja genetikai szinten – humán embrionális őssejtek kardiális differenciációjában szignifikáns eltérés mutatkozott az Y-kromoszóma hím-specifikus régiójának/MSY és az X-kromoszóma homológ régiójának génexpressziójában. Az Y-kromoszóma „hiányzó protein”/TBL1Y-expresszió szignifikáns növekedést, míg az X-kromoszóma „hiányzó protein”/TBL1X-expresszió szignifikáns csökkenést mutatott a differenciáció során [13]. A terhesség idején fellépő komplikációk is befolyásolhatják a kardiovaszkuláris nemi különbségeket már in utero, rövid- és hosszútávon egyaránt. Ezt bizonyítja, hogy állatkísérletes placentáris elégtelenség és intrauterin növekedési elmaradás (IUGR)-modellben a kontroll utódokhoz képest a megszületést követően ugyan 4 és 8 hetes korban mindkét nemben artériás középnyomás (MABP) növekedést mértek, és 12 hetes korra az IUGR-ben szenvedő hím utódokban a hipertónia megmaradt, IUGR-ben szenvedő nőstény utódokban azonban már normotenzio volt megfigyelhető [14]. Ez alapján nőstény utódokban, fiatal korban kialakult kardiovaszkuláris károsodások reverzibilisek lehetnek, míg hímek esetében ugyanez nem igazolódik. Férfiakban minden életkorban szoros a kapcsolat a szimpatikus aktivitás indexek és a vaszkuláris rezisztencia között, míg ez a kapcsolat hiányzik fiatal nőkben, azonban posztmenopauzában lévő nőkben megjelenik [15]. Fiatal, egészséges nők vérnyomása alacsonyabb, körükben gyakoribb az ortosztatikus hipotónia, a klinikailag dokumentált hipotenzív kórképek előfordulása és az ájulás, fiatal egészséges férfiakhoz képest [15]. Ugyanakkor in utero androgén többlet (DHT hatás) nőstény utódokban ezt a relatív védettséget átprogramozhatja, szívizom hipertrófiát és kardiovaszkuláris kockázat fokozódást okozhat [16]. A vérnyomás a kor előrehaladásával növekedést mutat, azonban e növekedés dinamikájában szintén nemi különbségek figyelhetők meg. Férfiakban a harmadik évtized körül elkezdődik a vérnyomás növekedése, a hipertónia előfordulási gyakorisága egyenletesen, az életkor előrehaladásával a hetedik évtizedre már 60-70%-ra növekszik. Ezzel szemben nőkben a korfüggő vérnyomásemelkedés a negyedik-ötödik évtizedig, körülbelül a

menopauza idejéig bezárólag sokkal lassabb, ezt követően a vérnyomásemelkedés üteme felgyorsul, 65-70 éves korra több nő szenved magasvérnyomás betegségben, mint férfi és nőkben a hipertónia előfordulása a kor előrehaladásával még tovább nő [15].

E nemi különbségek fiziológiás ismeretének, megértésének, majd patológiai vonatkozásban a hipertónia kialakulás, stabilizálódás nemi különbségeinek megismerése, megértése érdekében kísérletes állatmodelljeinkben a szív közvetlen vérellátásáért felelős intramurális kis koszorúsereket preparáltunk és vizsgáltunk, amelyekről korábban kevés szakirodalmi adat állt rendelkezésre.

1.2. Policisztás Ovarium Szindróma (PCOS)

A nők életében a reprodukív kor az első menstruációval, menarcheal veszi kezdetét, amelyet aztán ismétlődően további menstruációs ciklusok követnek a menopauzáig.

Reprodukív korban a nők védettséget élveznek a szív-érrendszeri betegségekkel szemben, amelyet az endogén ösztrogének hatásának tulajdonítanak. Ugyanakkor ismert, hogy a fertilis korban megjelenő szív-érrendszeri betegségek és hipertónia esetén a női nem független rizikófaktor, azaz célszervi károsodást és mortalitást fokozó tényező. Ezen betegek döntő többsége vagy anyagcsere-/ cukorbetegségben szenved, vagy legalább inzulin rezisztenciája, illetve policisztás petefészek szindrómája van.

A policisztás ovarium szindróma (PCOS) a reprodukív korú nőkben leggyakrabban előforduló kórkép. A PCOS prevalencia a különböző diagnosztikus kritériumrendszerek (National Institute of Health, Rotterdam, Androgen Excess - PCOS Society) alapján felállított PCOS diagnózis szerint 6-10% között mozog [17]. Pathomechanizmusa jelenleg ismeretlen, azonban annyi bizonyos, hogy a kórkép a GnRH-termelődés, az FSH és az LH szekréciójának zavarán alapul, amely magas LH/FSH-arányhoz, ezáltal a menstruáció zavarához, policisztás ovarium (PCO) morfológia kialakulásához, valamint fokozott androgén termeléshez vezethet, ezen túlmenően – egyéb okok mellett - a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) diszregulációja [18, 19], valamint az intrauterin életkorban emelkedett anyai anti-Müller hormon/AMH-szint [20, 21] is szerepet játszhat a PCOS pathomechanizmusában. A diagnózis felállítása hazánkban a nemzetközi gyakorlatnak megfelelően a Rotterdami kritériumrendszer alapján történik, amelybe az ultrahanggal igazolt PCO-morfológia, a hiperandrogén állapot klinikai és/vagy laboratóriumi paraméterei, valamint az oligo-anovuláció tartoznak. Ha ezek közül minimum két kritérium együttesen fennáll és egyéb endokrinopátiák kizárásra kerültek,

kimondható a PCOS diagnózisa [22]. PCOS-hez számos, egyéb szervrendszert érintő rendellenesség társulhat. A szisztémás kardiometabolikus rendellenességek közül az inzulinrezisztencia (IR), a csökkent glükóztolerancia (IGT), a kettes típusú cukorbetegség (T2DM), a diszlipidémia, a nem-alkoholos zsírmáj (NAFLD) és az obezitás gyakrabban fordulnak elő PCOS-ban [23, 24]. A felsoroltak mellé szív-érrendszeri rizikófaktorok, érkárosodás is társulhat, magas az ateroszklerózis prevalenciája, valamint a magasvérnyomás betegség már reprodukív korban kialakulhat [25]. Ezeket a rendellenességeket részben magyarázzák az artériák patológiás farmakológiai reaktivitás változásai, valamint lehetséges makro- és mikrovaskuláris károsodások: szubklinikus ateroszklerózis, megnövekedett a. carotis intima-media vastagság, endothel diszfunkció, coronaria artéria meszesedés [26, 27]. A PCOS-t valódi kardiovaskuláris kockázati tényezőnek kell tekinteni, amely súlyosan befolyásolja az életminőséget is [28]. Pszichoszexuális eltérések közül egyebek mellett a negatív énkép és az alacsony önértékelés miatt a depresszió és a szorongásos kórképek rizikója fokozódhat [29]. A fenti eltérések együttesen reprodukív korú nőkben kiemelt demográfiai jelentőséggel bírnak: szub- és infertilitást eredményeznek.

A D-vitaminhiány minden korcsoportban világszerte jelentős köz- és népegészségügyi probléma [30]. A PCOS és a D-vitaminhiány gyakori komorbiditás [31], 67-85% a D-vitamin elégtelenség, azaz a <20 ng/ml 25-hidroxi-D₃-vitamin szint [32] előfordulása policisztás petefészek szindrómában. A D-vitamin szkeletális és egyéb extraszkeletális hatásai mellett [33] fontos szerepet játszik a fiziológiás reprodukív működésben és a glükóz homeosztázisban is, amelyek alapvetően károsodtak PCOS-ben; így egy D-vitaminhiánnyal szövődött PCOS-ben még markánsabb tünetek és szövődmények jelentkezhetnek [34]. A fentiekben részletezett okok miatt fókuszáltuk figyelmünket a D-vitaminhiányra, illetve a D-vitamin-pótlásra PCOS vonatkozásában. Korai vizsgálatok a D-vitamin-kezelést szokásosan a csontritkulás vizsgálatokhoz hasonlóan D-vitaminszint mérés nélkül végezték és additív pozitív hatásokról számoltak be. Napjainkban célszerűbbnek tűnik a markánsabb D-vitaminhiány célértékre történő rendezése [35, 36]. Ezért a D-vitaminszint meghatározás már nemcsak a fertilitási programokban javasolható, hanem a multimetabolikus rizikó csökkentése céljából a PCOS differenciáldiagnosztikai kivizsgálásának részeként is ajánlott. A fertilis nők között fokozott szív-érrendszeri kockázatot okozó PCOS-t is tanulmányoztuk állatmodelljeinkben, szintén a korai érkárosodások azonosításának szándékával. PCOS állatmodellekben a D-vitaminkezelést, mint aktív terápiát értelmezve is folytattunk vizsgálatokat, illetve legújabb kísérleteinkben a szakirodalomban hiánypótló módon a PCOS-

ben sokkal gyakoribb és súlyosabb fokú D-vitaminhiány szív-érrendszeri hatásait vizsgáltuk az optimalizált D-vitaminpótlás ellenében.

1.3. Menopauza

A reprodukzív kor lezárásaként beköszönő perimenopauza időszakában elsősorban a menstruációs és ovulációs ciklusok rendszertelenné válnak, a petefészkek ösztrogén-termelése fokozatosan csökken, ezáltal csökken a negatív feedback, az FSH-szint fokozatosan emelkedik, végül a ciklus teljes elmaradásával bekövetkezik a menopauza, posztmenopauza időszaka. Az ösztrogénhiány korai, középtávú, valamint hosszú-távú következményei jelentkeznek. Korai következmények a vazomotoros tünetek/VMS: hőhullámok, ehhez kapcsolódóan esetleg vérnyomás kiugrások; pszichés zavarok közül ingerlékenység, álmatlanság. Középtávú következmények közé tartozik a genitourinális, vulvovaginális atrófia, amelynek során a hüvelyhám elvékonyodik, normál flórája meggyengül, sérülékenyebbé válik, ezáltal az alsó húgyúti infekciók gyakorisága fokozódik [37]. Mindemellett bőratrófia, valamint depresszió jelentkezhet. Hosszú-távú következmény a szekunder vagy posztmenopauzás osteoporosis, azaz csontvesztés, valamint a kardiovaszkuláris betegségek és a magasvérnyomás betegség kockázatának jelentős mérvű fokozódása. Ennek oka az endogén ösztrogénszint csökkenése, a hormontermelés elmaradása, amely a nők relatív kardiovaszkuláris védettségének megszűnéséért felelős a fertilis kort követően. A menopauza azonban nem betegség, hanem egy nő életének a hormonális állapotváltozás miatt bekövetkező fiziológias fázisa. Mivel minden ember egyedi, ezért a menopauza bekövetkezésének ideje és a kialakuló célszervi elváltozások is egyéni variabilitást mutatnak. Az utolsó menstruációs periódus (FMP) az a 12 hónapos időablak, amely definiálja a menopauza kezdetét, kialakulását [38]. Hosszmetszeti, longitudinális vizsgálatok szerint FMP-ben változatos ösztrogén-termelés és a progeszteron-termelés hiánya figyelhető meg [38, 39]. FMP alapján meghatározható az ún. transzmenopauza (konvencionális elnevezéssel perimenopauza), amely az FMP előtti egy évet és FMP-t követő két évet jelenti. Egy többváltozós modell a transzmenopauza, FMP várható idejének becslésére számításba veszi a szérum FSH, E₂, vizelet N-telopeptid/NTx koncentrációkat, a rassz/etnikumot, valamint az életkort, testmagasságot, súlyt, BMI-t, dohányzást, menstruációs vérzés mintázatát és a menopauza tranzíciót/MT-t, amelyek közül a végső modell az E₂, FSH, életkor, MT stádium, valamint a rassz/etnikum változókat tartalmazta, ugyanakkor klinikai hasznosíthatóság szempontjából nem találták megfelelő indikátoroknak

[40]. A Bayesiánus modell szerint, amelyben longitudinális FSH szint szerinti alcsoportok kapcsolatát vizsgálták a FMP-vel, azt találták, hogy két alcsoport szignifikáns asszociációt mutatott az FMP korral. Az első alcsoportban röviddel 40 éves kort követően kezdeti növekedés figyelhető meg az FSH-szintben, e csoportba tartozó nők esetében korábban jelentkezett FMP. A második alcsoportban egészen 45 éves kort követően sem mutatkozott növekedés az FSH-szintekben. Ez független kapcsolatban állt az AMH-szinttel, BMI értékre és dohányzásra történt súlyozást követően is. Tehát ebben a korosztályban az FSH-szint rendszeres mérése segíthet az FMP előrejelzésében [41].

A menopauza, mint állapot számos kardiovaszkuláris rizikót idéz elő: testzsír eloszlás változás, obesitas, IGT, lipid profil változás, emelkedett vérnyomás, fokozott szimpatikus tónus, endothel diszfunkció [5, 42]. Az erek biomechanikai funkciója romlik, farmakológiai érzékenységük megváltozik, sérülékenyebbé válnak [43]. A számos kellemetlen tünet enyhítésére/megszüntetésére a leghatásosabb terápia az individualizált hormonpótló kezelés (HPK) vagy menopauzális hormonterápia, mely 60 éves kor alatt kezdve a szív-érrendszeri rizikót is csökkenti. HPK gyanánt alkalmazható hatóanyag-csoportok: ösztrogén (monoterápiában a méh eltávolítását követően), ösztrogén és progesztogén kombináció (intakt viszonyok esetén), tibolon, valamint konjugált equin ösztrogén és bazedoxifen kombináció. A HPK kontraindikációja esetén szelektív szerotonin reuptake-gátló és szelektív szerotonin-noradrenalin reuptake-gátlók alkalmazhatók [44]. Vazomotor tünetek enyhítésére alkalmas HPKek: a tibolon, konjugált equin ösztrogén/bazedoxifen kombináció a leghatékonyabb. Randomizált kontrollált, megfigyeléses vizsgálatok és metaanalízisek alapján a standard dózisú ösztrogén HPK csökkentheti a miokardiális infarktus rizikót és a teljes mortalitást amennyiben a kezelés elkezdődött 60 évnél fiatalabb korban illetve a menopauza bekövetkezése 10 éven belüli. Ezzel szemben az ösztrogén és progesztogén HPK kombináció kardioprotektív hatásáról ellentmondóak és kevésbé meggyőzőek az adatok [44]. Az ösztrogén-pótlás előnyös hatása lehet a szívre nézve, ha azt korai menopauzában kezdik, amikor a női érzet még viszonylag egészségesebb, azonban hátrányos hatása lehet késői menopauzában, amikor ezen artériák már az ateroszklerózis jeleit mutatják [45].

Fontos a személyre szabott terápia alkalmazása, az endometrium védelme miatt azonban az ösztrogén mellé kiegészítő progesztogén kezelés javasolt. Korai hipoösztrogén állapotok esetén (hipogonadizmus, korai petefészek-kimerülés/POI, korai sebészi menopauza) legalább 52 éves korig ajánlott a hormonpótlás [46] Az „Időzítő/Timing hipotézis”, vagyis a HPK optimális időzítése szerint a HPK előnyös és hátrányos kardiovaszkuláris hatásai

összefüggenek azzal, hogy a menopauza kezdetéhez képest mennyire közeli időpontban kezdik el alkalmazni [47, 48]. A vaszkuláris egészség megőrzésében potenciális védő szerepe lehet a hipotézisnek és a HPK-nek fiatalabb posztmenopauzában lévő nők körében, valamint a fiatalabb korban elkezdett HPK hatékony lehet a mortalitás és a szív-érrendszeri morbiditás csökkentésében [47]. A 2002-ben lezárult Women's Health Initiative (WHI) klinikai vizsgálat – amely HPK-ben részesülő nőkben fokozott kardiovaszkuláris események bekövetkezését észlelte – eredményeinek korcsoport szerinti újraértékelése, valamint a Kronos Early Estrogen and Prevention Study (KEEPS) és Early Versus Late Intervention Trial (ELITE) randomizált kontrollált vizsgálatok eredményei szerint az alkalmazott HPK-sel összefüggő kardiovaszkuláris szövődmények kockázata alacsony azokban a nőkben, akik vagy 60 év alattiak vagy akikben a kezelést a menopauza kezdetéhez képest 10 éven belül kezdték [48].

A fenti okok miatt menopauza állatmodellekben tanulmányoztuk az erek funkcionális, biomechanikai, valamint hisztológiai tulajdonságainak változásait mind normális vérnyomás mellett mind hipertóniában. A korai, hormonhiány kiváltotta érelváltozások azonosítása céljából kezdődő, stabilizálódó hipertónia modellben a hipertóniás adaptáció és menopauza kombinált károsító hatását is vizsgáltuk. Emellett teszteltük a hormonpótló kezelés érkárosodásokat befolyásoló hatását.

2. Célkitűzések

Az egyes kísérlet sorozatokban izolált ereken vizsgáltuk a női nemi hormonhatások változásainak vaszkuláris következményeit. A legfontosabb nőgyógyászati állapotokat modelleztük: az élettani nemi különbségeket, ahol a női nem szív-érrendszeri védő hatását; illetve a hiperandrogén állapotot és a menopauzát, ahol a szív-érrendszeri veszélyeztetettség mechanizmusait kívántuk adott vonatkozásokban és összefüggésekben feltárni.

2.1. Az érrendszer nemi különbségeinek vizsgálata normo- és hipertóniában

- Azonosítani kívántuk a normális vérnyomás mellett jelenlévő élettani nemi különbségeket, illetve a hipertóniás vaszkuláris adaptáció eltéréseit.
- Ennek kapcsán a morfológiai, az érbiomechanikai és a farmakológiai – vaszkuláris reaktivitásban kimutatható érfiziológiai eltérések azonosítása volt a célunk.
- Hipertónia kialakítására angiotenzin II szubpresszor adagját alkalmaztuk, amely homogén kóroki háttérrel, 2-3 hét alatt idéz elő magasvérnyomást, így 4 hetes modellünkben a korai, kezdeti, stabilizálódó hipertóniás károsodások első lépéseit tanulmányozhattuk.

2.2. Kardiiovaszkuláris veszélyeztetettség fertilis korban – vaszkuláris változások hiperandrogén modellekben

- Manneras és Yanes modellje alapján olyan PCOS modellt kívántunk létrehozni, amelyben még nem alakul ki hipertónia és a metabolikus szindróma minden komponense. E modellben a hiperandrogén állapotot, a szisztémás inzulin rezisztenciát, és az ezekhez kapcsolódó korai érkárosodásokat tanulmányoztuk normális vérnyomású állatokban. Ennek során a D-vitamin, mint aktív kezelés hatásait is vizsgáltuk.
- Második PCOS modellünkben a hiperandrogén állapotot és a D-vitaminhiányt, mint gyakori komorbiditást vettük górcső alá. Kialakítottunk egy olyan, szintén normális vérnyomású állatmodellt, ahol izolált hiperandrogén állapotot illetve D-vitamin hiányt, valamint a két károsító hatás együttesét is tudtuk vizsgálni a szisztémás inzulinrezisztenciára és az erekre.

A modellek validálását követően a következő kérdéseket vizsgáltuk:

Az első PCOS modellben:

- Kialakul-e vaszkuláris inzulin rezisztencia kis rezisztencia ereken illetve aortán, befolyásolja-e ezt a D-vitamin kezelés?
- Látunk-e prehipertenzív érbiomechanikai illetve érreaktivitásbeli változásokat a kisereken illetve az aortán, tekintettel arra, hogy a hosszabb kezelés már hipertóniát okoz? Milyen reakcióutak érintettek? Miográfus vizsgálatokban elsőként a NO és a COX útvonalat, immunhisztokémiás szövettani metszeteken pedig ezek mellett az oxidatív-nitratív stressz változásait, illetve az inzulin, D-vitamin receptor expressziót kívántuk ellenőrizni.
- Károsodik-e az ösztadiol függő relaxáció hiperandrogén állapotban?
- Változtat-e a D-vitamin kezelés a feltételezett prehipertenzív érkárosodásokon?

Második PCOS modellünkben:

- Elsőként a korábban kimutatott inzulin rezisztencia részleteit kívántuk feltárni; azaz milyen mechanizmussal okoz szisztémás, illetve vaszkuláris inzulin rezisztenciát a hiperandrogén állapot, illetve a D-vitaminhiány?
- Additív-e a két károsító hatás az anyagcsere, a petefészkek, illetve a koszorúerek vonatkozásában?

2.3. A menopauza és a hormonpótlás ér-hatásai

- Hogyan változnak a szív vérellátásáért közvetlenül felelős intramurális kis coronaria arteriolák mechanikai és farmakológiai tulajdonságai menopauza modellben és hormonpótlás hatására normális vérnyomás esetén?
- Hogyan befolyásolja az akut ösztadiol hatást artéria saphenán a krónikus hormonhiány és hormonpótlás?
- A vénás rendszer változásai kevésbé voltak ismertek munkacsoportunk vizsgálatait előtt. Ezért korábbi munkánk folytatásaként tisztázni kívántuk, hogy a vénás mechanika változásai mellett kimutatható-e eltérés a vénás kontraktilitásban menopauza modellben, és ezt hogyan befolyásolja a hormonpótló kezelés normális vérnyomás esetén?
- Milyen vénás károsodást indukál női nemi hormonhiányos (ovarietomizált) patkányokban az egyik legismertebb, érfal remodellinget kiváltó faktor, az angiotenzin

II által okozott hipertónia, másrészt hogyan befolyásolja ezt a folyamatot a női nemi hormonok pótlása?

3. Módszerek

3.1 Alkalmazott állatmodellek

Disszertációmban az egyes női hormonális állapotok kardiovaszkuláris védő-, illetve károsító hatásaira vonatkozó vizsgálatainkat ismertetem.

Ennek keretében vizsgáltuk a nemi különbségeket normális vérnyomás esetén (1A), a nemi különbségeket magasvérnyomás esetén (1B) – ahol a női nem védő hatásait feltételeztük. Kardiovaszkuláris veszélyeztetettséget feltételeztünk a policisztás petefészek szindróma klinikai képe alapján hiperandrogén modelljeinkben, illetve menopauza modelljeinkben is. Tanulmányoztuk a D-vitaminkezelés hatását hiperandrogén állapotban (2A) és a D-vitaminhiány és hiperandrogén állapot egyedi és kombinált hatásait (2B). Vizsgáltuk a hormonhiány és hormonpótás hatásait normális vérnyomás esetén (3A) és hipertóniában (3B). A modellek részletes leírása a szövegben található, melyeket a későbbiekben az 1. táblázatban szereplő kódokkal idézek.

1. táblázat: Az állatkísérletes modellek összefoglalása.

Modell típusa	Normotónia	Hipertónia
Nemi különbségek	1A	1B
Kardiovaszkuláris veszélyeztetettség fertilis korban	Hiperandrogén modell + D vitamin kezelés védő hatása (2A)	
	Hiperandrogén állapot + D-vitamin hiány közös károsító hatása (2B)	
Menopauza modellek	Sebészi és farmakológiai ovariectomia (3A1, 3A2)	hipertónia + sebészi ovariectomia (3B)

3.1.1. Állatmodellek az erek nemi különbségek vizsgálatára (1A és 1B)

A nemi különbségek témakörében a balkamrai, intramurális coronaria arteriolák in vitro mechanikai és farmakológiai reaktivitását vizsgáltuk nőstény és hím Sprague-Dawley patkányokból származó érszegmenseken normo- és hipertóniában [49].

3.1.1.1. Kísérleti állatok –Nemi különbségek normális vérnyomás esetén (1A)

Ivarérett, korban illesztett, hím (n=10, 391±16 g súlyú) és virgo nőstény (n=10, 260±11 g súlyú) Sprague-Dawley patkányt használtunk a kísérletek során. Az állatok normotenziósak voltak és nem volt szignifikáns különbség az átlagos artériás középnyomásuk (MABP) és egyéb vitális paramétereik között. Az állatkísérletet a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” [NIH publication No. 85-23, 1985], valamint az eurokonform magyar állatvédelmi törvény az (XXVIII/1998) rendelkezései szerint végeztük [Állatkísérletes engedélyek száma: TUKEB 36/1999 és 63/2003], (1. táblázat).

3.1.1.2. Kísérleti állatok – magasvérnyomásos nemi különbségek modell (1B)

2 hónapos, korban illesztett Sprague-Dawley patkány (nőstények és hímek, n=10-10), Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) 220-250 grammos nőstények és 280-320 grammos hímek. A nőstényekbe és a hímekbe egyaránt szubkután ozmotikus minipumpa került beültetésre Nembutál anesztéziában, steril körülmények között. 100 ng/tskg/perc ATII-t infundált a minipumpa. Simon G, Ábrahám Gy. és munkacsoportjuk korábbi vizsgálatai alapján tudjuk, hogy ez a dózis 2-3 hét múlva okoz krónikus vérnyomás emelkedést [50], akut vérnyomás hatás nélkül. Célunk a korai hipertónia okozta érkárosodások nemi különbségeinek vizsgálata volt, ezért választottuk ezt a modellt (TUKEB engedély száma: 22.1/2960/003/2009), (1. táblázat).

3.1.2. PCOS állatmodellek

3.1.2.1. Első PCOS modell: hiperandrogén állapot és D-vitaminpótlás, mint aktív kezelés (2A)

Első PCOS modellünket Manneras és m társai munkája alapján építettük fel [51] 7,5 mg dihidrotesztoszteront (DHT) (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) tartalmazó folyamatos hatóanyag felszabadulást biztosító pelletet alkalmaztunk 70 napig. A gyártó garantálta, hogy naponta 83 µg hatóanyag szabadul fel 90 napon keresztül egyenletesen az alkalmazott pelletből. Anesztézia során (Nembutal, 45 mg/kg i.p., Phylaxia-Sanofi, Budapest, Magyarország) steril körülmények között ivarérett, 100-140 g súlyú, 21-28 napos nőstény Wistar patkány hátbőre alá s.c. (Simmelweis Egyetem Állatház, Budapest, Magyarország, Charles River-től származó állatok) DHT-t tartalmazó pelletet ültettünk (DHT-csoport). Az állatok egyharmda álműtéten esett át (Kontroll-csoport). A műtéteknél antibiotikum

profilaxisként 20 mg amoxicillint + 4 mg klavulánsavat alkalmaztunk (Augmentin, Glaxo Smith Kline, Memphis, USA) i.m..

DHT-kezelt állatok fele hetente 120 ng/100 g 1,25-(OH)₂-D₃-vitamin injekciós kezelésben (Calcijex inj. 2 µg/mL, Abbott Laboratories, DHT+D₃ csoport) részesült [52]. A többi állat vivőanyagot kapott. Semmilyen sebészi komplikáció nem jelentkezett az állatoknál a beavatkozásokhoz kapcsolódóan. Hagyományos patkánytáp és csapvíz szabadon állt az állatok rendelkezésére. 8 hetes DHT-kezelést követően Orális glükóz tolerancia tesztet (OGTT) végeztünk rövid éter narkózisban. Éjszakai koplalás után éhomi és 0,3 g/100 tsg per os glükóz oldat beadását követően 120 perccel vércukor és plazma inzulinszinteket mértünk [53],[54]. A vércukorszintet Dcont Personal Akucheck (77 Elektronika, Budapest, Magyarország) mérővel mértünk. Az inzulin méréshez Rat/Mouse Insulin ELISA-t (Millipore, Burlington, MA, USA) használtunk. Szérum fruktózamin szinteket Roche 930010-teszttel mértünk. (TUKÉB IRB engedélyszám: 22.1/2960/003/2009), (1. táblázat).

Korai PCOS modellünkben egyidejűleg vizsgáltuk az a. gracilis (muszkulokután rezisztencia arteriola, izolált ér modell, mikroangiometria) és a thoracalis aorta gyűrűk („wire myograph”) változásait.

3.1.2.2. Második PCOS modell: hiperandrogén állapot, illetve D-vitaminhiány és -pótlás érhatai (2B)

46 ivarérett (4 hetes), átlagosan 106±7 g súlyú nőtény Wistar patkányt négy csoportba osztottunk (Simmelweis Egyetem, Charles Rivers, Budapest, Magyarország). A nyolc hetes kezelés során 24 állat kapott teljes, normál diétát (ssniff Gernay – Standard Maintenance (SM) rat/mouse complete diet, 1000 NE/kg D₃-vitamin). Az optimális szérum D-vitamin szint elérésére (30 ng/mL szérum 25-OH-kolekalciferol) ezek az állatok per os D-vitamin kiegészítésben is részesültek. A D-vitamin-pótlott állatok egyik fele transzdermális tesztoszteron-kezelést is kapott (VD+/T+-csoport, n=12), míg a másik 12 állat képezte a D-vitamin-pótlott, tesztoszteron-kezelésben nem részesült csoportot (VD+/T- -csoport, n= 12). Összesen 22 állat kapott D-vitamin-mentes diétát (Ssniff Germany – Experimental for (EF) rat/mouse complete VitD-free diet: kevesebb, mint <5 NE/kg D₃-vitamin tartalmú; a teljes vizsgálati periódus alatt kiegészítő D-vitamin bevitel kizárt volt), amely markáns VDD-t alakított ki a kezelés során. Ezen állatok egyik fele tesztoszteron-mentes volt (VD-/T- -csoport, n=11), míg másik felük transzdermális tesztoszteron-kezelésben részesült (VD-/T+ -csoport, n=11).

A D-vitamin-pótlás menete: a 2. hét kezdetén 500 NE telítődózt alkalmaztunk per os, majd a 4. héttől kezdve hetente (a rendszeres testsúlymérések alapján) az elfogyasztott táp D-vitamin tartalmát is beszámítva 300 NE/tskg-ra szubsztituáltuk a bevitt a magas normális/optimálisnak tartott D-vitamin szint elérése érdekében.

A hátbőrt rendszeresen leborotváltuk a tesztoszteron-kezelés előtt. A tesztoszteron-kezelés során a csoportoknál hetente ötször transzdermális tesztoszteron gélt alkalmaztunk a kísérlet 2. napjától kezdve. 0,033 mg/tskg dózist alkalmaztunk, amely közel tízszeres plazma tesztoszteronszint emelkedést eredményezett nőstény állatokban. (1. táblázat). A teljes vizsgálat során hetente ötször mértük az állatok testsúlyát. Testtömeg gyarapodási arányt az alábbi képlettel számoltunk:

$$\text{Testtömeg gyarapodási arány}(\%) = \frac{\text{végső testsúly}}{\text{kezdeti testsúly}} * 100$$

Az állatok a kezelési protokollban leírt patkánytápokhoz és csapvízhez szabadon hozzájuthattak. A vérvétel felületes éter narkózisban zajlott. A kísérlet végén a korábbiakhoz hasonlóan Nembutál anesztéziát alkalmaztunk (45 mg/kg i.p.) [55]. (TUKEB IRB: 8/2014 PEI/001/1548-3/2014).

Orális Glükóz Tolerancia Tesztet (OGTT) végeztünk a kísérlet 6. hetén. Éjszakai koplalást követően per os 30%-os glükóz oldatot juttattunk az állatokba [56]. A 0., 60. és 120. percben vércukorszintet a korábbiakhoz hasonlóan; Dcont Personal Accucheck (77 Elektronika) mérővel, a szérum inzulin szintet pedig 0. és 120. percekben ELISA-val (Millipore) mértük. Homeosztatisz modell becslést (HOMA-IR-t) számoltunk az alábbi képlettel:

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{éhomiz plazma inzulin} \left[\frac{\text{mU}}{\text{L}}\right]}{22,5} * \text{éhomiz plazma glükóz} \left[\frac{\text{mM}}{\text{L}}\right]$$

A 8. héten farokvénából vért vettünk. A mintákat nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával/HPLC-vel vizsgáltuk. Az 5-dihidrotesztoszteron, 5-hidroxikolekalciferol, progeszteron és tesztoszteron szintek meghatározása Flexar FX-10 ultrateljesítményű folyadékkromatográfiával/UPLC és Sciex 5500 QTRAP tandem tömegspektrométer pozitív elektropray ionizációs módjában történt, részletes leírását az eredeti közleményben csatoltuk [55].

Az újabb PCOS modellünkben született első közleményben a kombinált (hiperandrogén állapot és D-vitaminhiány) modell validálását írtuk le és coronaria arteriolák farmakológiai reaktivitásának vizsgálatával foglalkoztunk.

3.1.3. Menopauza modellek (3 A, B)

Nullipara, nőtény Sprague-Dawley patkányokat alkalmaztunk az egyes kísérletekben. Az ovariectomiát és a hormonkezelési protokollt a munkacsoportunk és más szerzők által leírtak szerint végeztük [57-62].

Röviden: farmakológiai és sebészi kasztrációs protokollokat alkalmaztunk (1. táblázat).

3.1.3.1. Farmakológiai ovariectómia

Korai kísérleteinkben a farmakológiai ovariectomiát 750 µg/kg i.m. triptorelin alkalmazásával hoztuk létre, melyet minden 4. héten intramuscularis injekció formájában adagoltunk. Ezen eljárás validált és alapvetően megegyezik a sebészi ovariectómia által kiváltott hatással, azzal a különbséggel, hogy nem igényel sebészi beavatkozást [57-62]. A farmakológiailag ovariectomizált állatok egyik csoportja egyidejűleg HPK-kezelésben is részesült, mellyel korábban validált méréseink szerint a nemi hormon szintek visszaállítása megtörtént [58-60]. A maradék farmakológiailag ovariectomizált állat kezelése vivőanyaggal történt, a HPK-kezelés időrendjének megfelelően. A farmakológiai ovariectómiában nem részesült állatok csak vivőanyag kezelésben részesültek. Hagyományos patkány táp és csapvíz szabadon az állatok rendelkezésére állt (TUKÉB 36/1999).

3.1.3.2. Sebészi ovariectómia

Ugyancsak ivarérett, virgo nőtény Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, USA/Németország) patkányokat alkalmaztunk ezen kísérleteinkben is. Nembutal anesztéziában (40 mg/kg i.m.) bilaterális ovariectomiát (O-csoport) hajtottunk végre steril körülmények között. Az ovariectomizált állatok egy része egyidejűleg hormonpótló kezelésben is részesült (HPK-csoport) [57, 58, 62]. Orvosi és sebészi komplikáció nem jelentkezett. Hagyományos patkánytáp és csapvíz szabadon az állatok rendelkezésére állt (TUKÉB 36/1999).

3.1.3.3. Hormonpótlás

Az ovariectomizált állatok egy része egyidejűleg női nemi hormonpótló kezelésben is részesült (HPK): 450 µg/kg i.m. ösztadiol-propionát minden 7. nap illetve 15 mg/kg i.m. medoxyprogeszteron-acetát minden 14. nap, mely korábbi méréseink alapján megfelelően hatékony ovariectomizált patkányokban a női nemi hormonszintek visszaállítására (fiziológias hormonszinteket eredményez) [57, 58, 62]. A többi patkány a szexhormonok

vivőanyagait kapta. Az egyes kísérletekben alkalmaztunk izolált hormonpótlásokat (csak ösztrogén, illetve csak medroxiprogesteron), illetve kombinált kezelést is.

3.1.3.4. Hipertóniás protokollok

A hipertóniás kísérletekben az előző fejezetben leírtaknak megfelelően, krónikus angiotenzin II adagolással hoztuk létre a hipertóniát (1B modell alapján) és az ALZET pumpák beültetését a sebészi ovariectómiával együtt végeztük el. A kontroll állatok mindkét beavatkozás álműtétjében részesültek. (TUKEB: 36/1999).

3.1.3.5. A menopauza és hormonpótlás hatásainak vizsgálatára alkalmazott ér modellek

Érfiziológiai kísérleteinkben próbáltuk szisztematikusan felderíteni a női nemi hormonhiány és hormonpótlás, valamint egyidejű károsító hatásként az angiotenzin-hipertónia direkt érhatásait különböző érterületeken.

A 2. táblázatban összefoglaltam az egyes vizsgálatok csoportjait és a vizsgált érterületeket, kérdéseket.

A 2. táblázatban látható a menopauza-hormonpótlás modellben vizsgált erek összesítése. Az egyes rövidítések: kontroll (K), ovariectómián (OV) átesett, fentiek mellett ösztradiol pótlásban (+E), illetve fentiek mellett kombinált (ösztrogén + progeszteron) pótlásban (+HPK) részesült állatok. ATII – krónikus szubpresszor angiotenzin II kezelésben részesült csoport. Az egyes kezelések kombinációit a táblázat részletezi. A modellek leírása korábban megtörtént, a vizsgált erekre vonatkozó protokollok később kerülnek ismertetésre.

2. táblázat: A menopauza-hormonpótlás modellek és a vizsgált érterületek összefoglalása

Ér-típus	Normális vérnyomás	ATII hipertónia
vena saphena	K / OV/ OV+komb HPK	OV/ OV+ATII/ OV+ATII+k.HPK
arteria saphena	OV/ OV+E – akut E	
arteria coronaria (LAD)	K/OV/OV+komb HPK	

3.2. Felhasznált anyagok az egyes modellekben

Állatkísérletes munkáink során az anesztéziához 45 mg/ttkg Nembutal-t (Pentobarbitál-nátrium, Phylaxia-Sanofi, Budapest, Magyarország) használtunk. Az in vitro vizsgálatokhoz használt normál Krebs-Ringer-oldat az alábbiakat tartalmazta mM/L-ben megadva: 119 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 NaH₂PO₄; 1,17 MgSO₄; 24 NaHCO₃; 2,5 CaCl₂; 5,5 glükóz és 0,0345 etiléndiamin-N, N, N, N-tetraecetsav/EDTA. A kalciummentes Krebs oldat összetétele mM/L-ben megadva: 92 NaCl; 4,7 KCl; 1,18 NaH₂PO₄; 20 MgCl₂; 1,17 MgSO₄; 24 NaHCO₃; 5,5 glükóz; 2,0 etilén-glikol-bisz(2-aminoetiléter) -N, N, N, N-tetraecetsav/EGTA és 0,025 EDTA. Az oldatok pH=7,4 értéken való stabilizálásához az artériák esetében 37°C -on 5% CO₂; 20% O₂; 75%N₂ összetételű gázkeverékkel voltak buborékoltatva, míg vénákon 5% CO₂; 5% O₂; 90%N₂ összetételű gázkeveréket használtunk a fiziológiás pH és oxigenizáció elérésére. Tromboxán-A₂-receptor-agonista U46619-et (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA/Budapest, Magyarország), és Bradykinint (BK) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA and Budapest, Magyarország) használtunk. Az anyagok a vizsgálat napján frissen készültek.

3.2.1. Felhasznált anyagok az angiotenzin II hipertóniás modellekben

A fentiek mellett a krónikus sebészeti beavatkozásokat követően 100.000 NE penicillin (TEVA-Biogal, Debrecen, Magyarország) került beadásra intramuszkulárisan az infekciók megelőzése érdekében. Az angiotenzin II- hipertónia protokoll PhD disszertációmban, illetve az alapjául szolgáló közleményekben részletesen leírásra került [50, 62].

Röviden: a hipertóniát szubkután ozmotikus minipupával (Alzet 2 ML4, Durect co., USA) bejuttatott angiotenzin-II-acetát (ATII) (Sigma-Aldrich Co St. Louis, MO, USA és Budapest, Magyarország) segítségével hoztuk létre (100ng/tskg/min adagban alkalmazva). Egyebekben a normotóniás modellben leírt anyagokat használtuk.

3.2.2. Felhasznált anyagok PCOS modellekben

3.2.2.1. Felhasznált anyagok az első PCOS modellben

Első kísérletes PCOS-modellünket Manneras és munkacsoportja által[51] leírtak alapján alakítottunk ki. 7,5 mg DHT-t (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) tartalmazó folyamatos felszabadulást biztosító pellet beültetésével, 70 napig kezelve az állatokat. Naponta 83 µg felszabadulást 90 napon keresztül biztosító terméket a gyártó garantálta. Aktív kezelésként 1,25-(OH)₂-D₃-vitamint használtunk (Calcijex injekció 2 µg/mL, Abbott Labs., Illinois, USA). A pellet beültetést a korábban leírt pentobarbitál

anestéziában végeztük (Nembutal, Phylaxia-Sanofi, Budapest, Magyarország), az infekciók megelőzése érdekében 0,2 mL fiziológiás sóoldatban feloldott 20 mg amoxicillin + 4 mg klavulánsav (Augmentin, Glaxo Smith Kline, Memphis, USA) i.m. antibiotikum-profilaxis mellett. A nKR oldat és a Ca^{2+} -mentes nKR oldat összetételét és az erek előkészítését a korábbiakban megadtam.

Felhasznált anyagok és forrásuk: Noradrenalin, acetil-kolin-klorid, 17- β -ösztradiol, L-NAME és indometacin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA és Budapest, Magyarország), humán rekombináns inzulin (Actrapid pentafill 100 NE/mL, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, Bagsvard, Dánia). A felhasznált anyagokat a vizsgálatok napján frissen készítettük el nKR-oldatban.

A COX-2 és az eNOS antitesteket az Abcam (Cambridge, UK); a szekunder antitesteket, normál kecske szérumot, az avidin-biotinilált enzim komplex kitet és a DAB-ot a Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) cégen keresztül szereztük be. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a gyártók protokolljai szerint végeztük.

3.2.2.2. Felhasznált anyagok a második PCOS modellben

A második PCOS modell létrehozásához tesztoszteron gél alkalmaztunk transzdermálisan (Androgel 1%, Laboratoires Besins International S. A., Párizs, Franciaország). A D-vitamin pótláshoz per os kolekalciferol szuszpenziót (Vigantol olaj 20,000 NE/mL, Merck/Merck Serono, India) használtunk. Az új vizsgálati szériában alkalmazott mindkét kezelés nonivazív gyógyszer bevitelt tett lehetővé. Az alkalmazott tápok és forrásukat az állatmodelleknél ismerttettem.

3.2.3. Felhasznált anyagok a menopauza modellekben

A GnRH-analóg, triptorelin (Dekapeptil depó) a Ferring (Kiel, Németország) cégtől került beszerzésre. A krónikus kezeléshez alkalmazott ösztradiol-propionáthoz (Richter, Budapest, Magyarország) használt törzsoldat frissen készült oleum helianthi-ban (patikai steril napraforgóolajban; 0,9 mg/mL), az Upjohn (Puurs, Belgium) cégtől származó medroxyprogeszteron-acetát (Depo-Provera) normál sóoldatban feloldva 30 mg/mL koncentrációban került felhasználásra. Noradrenalin (Arterenol) a Hoechst (Frankfurt am Main, Németország), a papaverint (Papaverinum hydrochloricum) a Chinoi (Budapest, Magyarország) cégtől szereztük be. A Nembutal anestézia a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt, hasonlóan az antibiotikum profilaxishoz és az ozmotikus pumpával bevitt

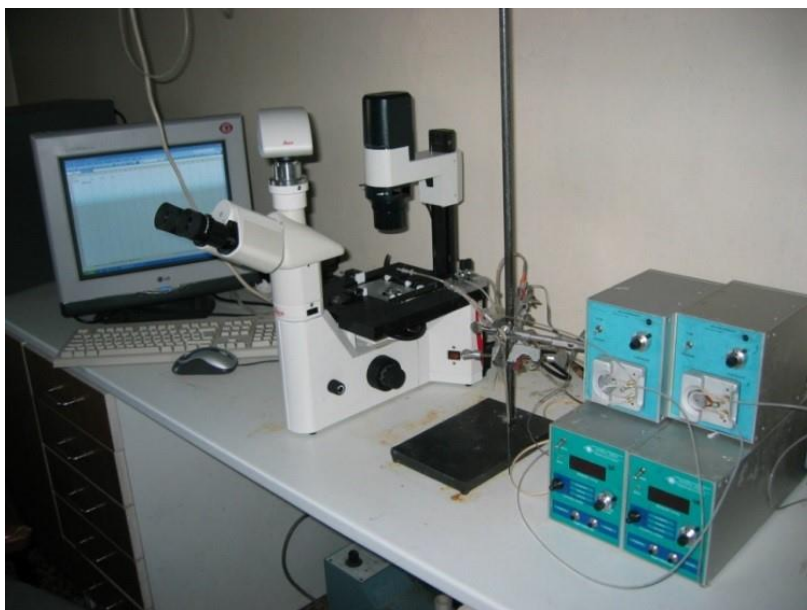
angiotenzin-acetáthoz. Minden kísérletünk során normál Krebs-Ringer oldatot használtuk, melynek összetételét a korábbiakban már ismerttettem.

3.3. Vizsgált érterületek és protokollok

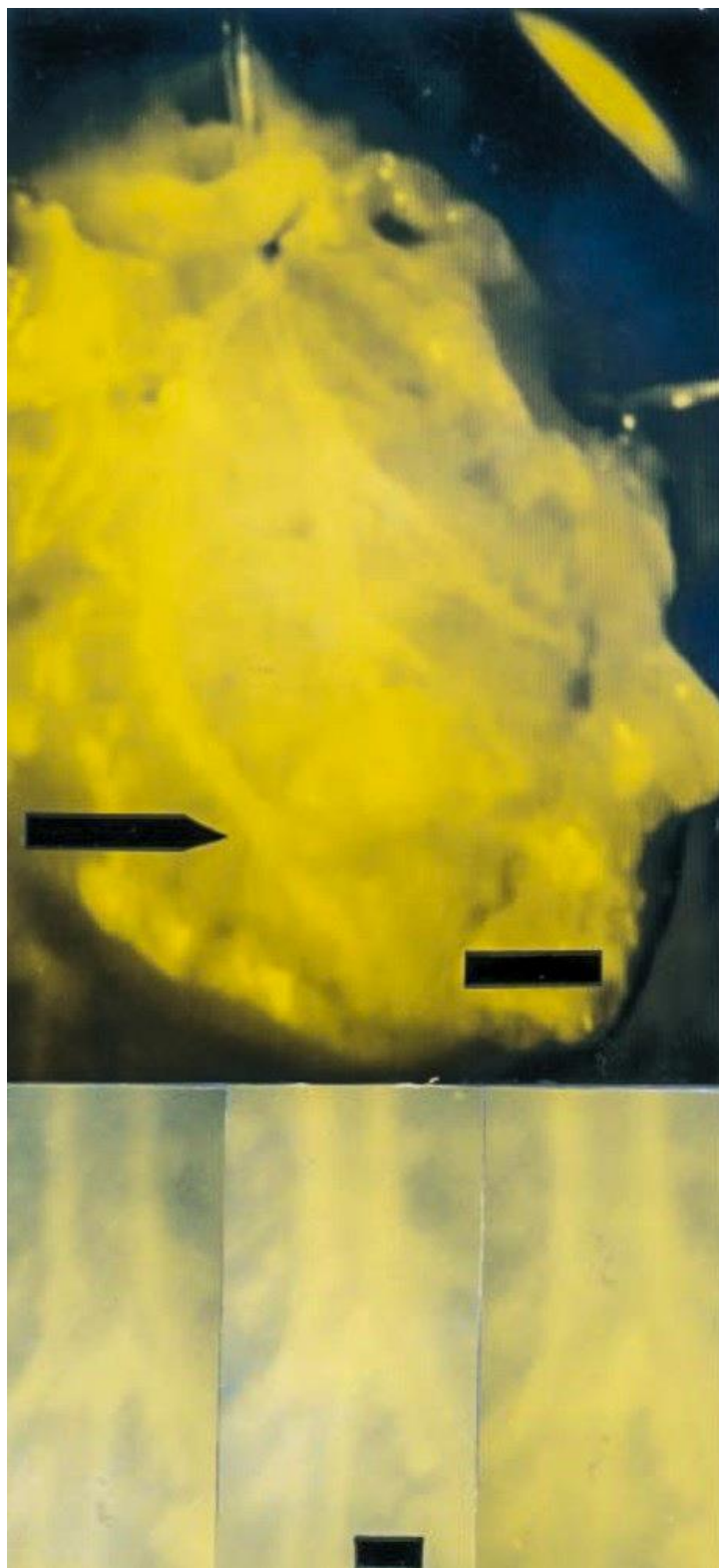
Korai modelljeinkben a szisztémás keringés jól használható teszt ereit, az izolált arteria és vena saphenát használtuk, majd ezt követően az a. gracilist és a thoracalis aorta gyűrűket, illetve a korábban kevésbé ismert intramuralis coronaria arteriolákat vizsgáltuk.

3.3.1. Kísérleti protokoll coronaria arteriolákon (1A, 1B, 2B, 3A modellekben)

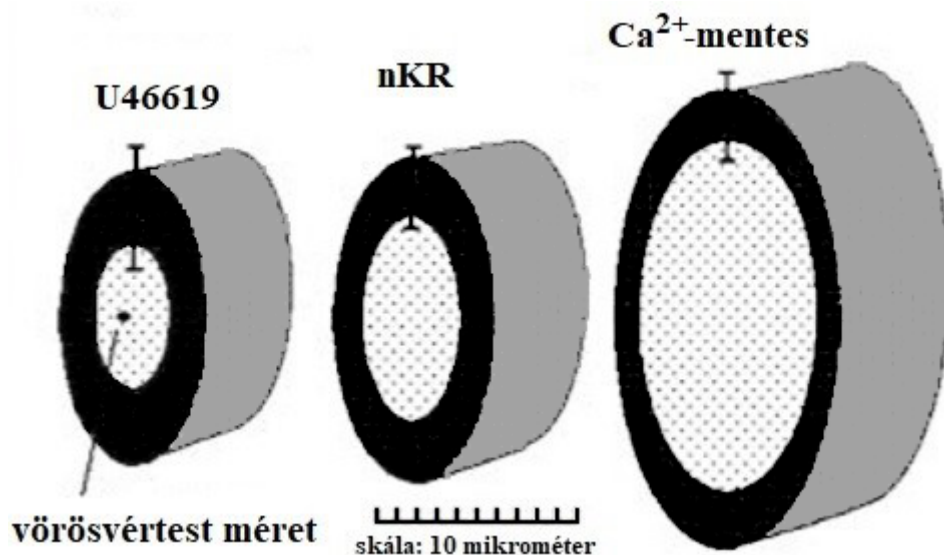
Az állatok mellkasának megnyitása után a szívet eltávolítottuk, és hideg, oxigenizált nKR-oldatba helyeztük. A bal anterior descendens coronaria artéria szekunder intramurális ágaiból az 1A, 1B és 3A modellekben átlagosan 200 μm , a 2B modellben 100-150 μm átmérőjű arteriola szegmenseket preparáltunk (1. ábra) [63, 64].



1. ábra: A) A mikroangometriás rendszer, illetve B) A szervfürdőbe helyezett intramuralis coronaria szegmens mikroangiometriás fotója.



2. ábra: A LAD coronaria ágrendszer érhálózata in situ, a preparálás kezdetén kis (6x) és nagy (40x) nagyítással.



3. ábra: az ex vivo, mikrokanülökre helyezett izolált coronaria változásai (normál Krebs Ringer oldatban, TxA₂ agonista U46619 vazokonstriktióban és teljes vazorelaxációt, azaz passzív értónust eredményező kalciummentes normál Krebs Ringer oldatban [63].

Az izolált érszegmenseket nKR-oldattal töltött szervfürdőben, két végükön mikrokanülre helyeztük és in vivo hosszukra állítottuk be. Mindkét kanül szerv pumpához csatlakozott (Living Systems, Burlington, VT, USA) és mikroangometria segítségével áramlásmentes állapotban a nyomás változtatásával az erek külső és belső átmérőit mértük [63].

3.3.1.1. Mérési protokoll izolált coronariákon (1A, 1B, 3A)

A coronaria arteriola szegmenseket az egyensúlyi állapot eléréséig, 30 percig 50 Hgmm intraluminális nyomáson, áramlásmentes nKR-oldatban inkubáltuk. Ezt követően a nyomást 2 Hgmm-re csökkentettük, majd először 30 Hgmm-re, ezt követően lépcsőzetesen 20 Hgmm-enkénti emeléssel 90 Hgmm-ig növeltük. Adott nyomáson 5 perc inkubációt követően mértük az egyensúlyi átmérőt [49, 65].

A szervfürdőbe 10^{-6} M koncentrációjú TxA₂-receptor-agonistát (U46619-et) adva, 10 perc inkubációs időt követően, ismételten az intraluminális nyomás változtatásával mértük az érszegmensek egyensúlyi átmérőjét. Ezt követően 10^{-6} M koncentrációjú bradykinint (BK) adtunk a szervfürdőbe, és 50 Hgmm-en mértük meg az ekvilibrációt követően a stabil érátmérőt. Végül kimosást követően Ca²⁺-mentes Krebs-oldatban 20 perc inkubációt követően az intraluminális nyomás hasonló változtatásával az erek passzív átmérőit rögzítettük [49, 65].

3.3.1.2. Számított paraméterek (1A, 1B, 3A)

A külső és belső átmérőt a korábban leírtak szerint mértük. Az átmérő leolvasások pontossága $\pm 1,5 \mu\text{m}$ volt. Az alábbi biomechanikai paramétereket számoltuk coronariák mellett a többi éren is, ahol farmakológiai és mechanikai vizsgálatok történtek [66]:

Spontán tónust aktív feszülésként fejeztük ki, minden intraluminális nyomáson kiszámolva:

$T_{nKR} = \frac{r_{iCa-mentes} - r_{i nKR}}{r_{iCa-mentes}}$, ahol $r_{iCa^{2+}-mentes}$ és $r_{i nKR}$ a Ca^{2+} -mentes és nKR-oldatokban mért belső sugár.

A TXA_2 -értónust az adott intraluminális nyomásokon Ca^{2+} -mentes Krebs-oldatban mért és TXA_2 -tartalmú nKR-oldatban mért belső sugár alapján az alábbi képlettel számítottuk ki:

$$T_{TXA2} = \frac{(r_{iCa-mentes} - r_{iTXA2})}{r_{iCa-mentes}}$$

Bradykinin indukálta tónust is aktív feszülésként fejeztük ki: $T_{BK} = \frac{r_{iCa-mentes} - r_{iBK}}{r_{iCa-mentes}}$, ahol $r_{iCa^{2+}-mentes}$ és r_{iBK} a Ca^{2+} -mentes oldatban mért és bradykinin hatására kialakult belső sugár.

$\sigma = \frac{p \cdot r_i}{h}$, ahol σ a tangenciális falfeszülés, p az aktuális transzmurális nyomás értéke, r_i a belső sugár és h a falvastagság.

$D = \frac{\Delta V}{\Delta p V}$, ahol D az inkrementális disztenzibilitás, ΔV a Δp nyomásra bekövetkező lumen volumenváltozás, és V az eredeti lumen volumen.

A cilindrikus érszegmens (E_{inc}) inkrementális elasztikus modulusát - Cox nyomán - az alábbi képlettel számoltuk ki [66]:

$E_{inc} = \frac{2r_i^2 r_o}{(r_o^2 - r_i^2)} \times \frac{\Delta p}{\Delta r_o}$, ahol r_i és r_o a belső és külső sugár, és Δr_o a Δp nyomásra bekövetkező külső sugárváltozás.

3.3.1.3. Coronaria arteriolák nyomásangiometriája (2B modellben)

Az állatokból 8 hét kezelést követően a fentiekben leírtak szerint $100-150 \mu\text{m}$ in vivo külső átmérőjű coronaria arteriola szegmenseket preparáltunk a LAD intramurális hálózataból és hasonlóan szervfürdőben mikrokánulókra helyeztük és áramlásmentes körülmények között normál hosszukra nyújtottuk és 50 Hgmm intraluminális nyomáson 30 percig inkubáltuk, és az arteriolák belső és külső átmérőváltozásait vizsgáltuk.

Megmértük az arteriolák egyensúlyi átmérőit, majd emelkedő dózisú inzulint adagoltunk (30, 100, 300 és 600 mIU/mL, 1 IU=0,035 mg inzulin) szintén 8 perces inkubációs időekkel. Az inzulin kimosását követően a maximálisan relaxált átmérőt oxigenizált, melegített, Ca^{2+} -mentes oldatban mértük. A visszamaradó inzulin tónust a passzív (teljesen relaxált) sugárhoz viszonyított aktuális sugár értékével fejeztük ki, %-ban: $T_{inz} (\%) = \frac{(R_{Ca^{2+}-mentes} - R_{inz})}{R_{Ca^{2+}-mentes}} * 100$

ahol R_{inz} az inzulint tartalmazó nKR-oldatban mért belső sugár és $R_{Ca^{2+}-mentes}$ a Ca^{2+} -mentes oldatban mért belső sugár.

3.3.1.4. Coronaria arteriolák immunhisztokémiai vizsgálata (2B modellben)

Paraffinba ágyazott szövetblokkokból készült natív metszeteken Banch/Mark ULTRA automata immunhisztokémiai (IHC)/in situ hibridizáció (ISH) metszetfestő rendszer (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) segítségével, valamint monoklonális egér anti IR béta (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) és poliklonális nyúl anti-VDR (Abcam, Cambridge, Nagy Britannia) antitestekkel vizsgáltuk az inzulin-receptor béta (IRB) és D-vitamin receptor (VDR) expressziót. A specifikus kötődés kimutatása színes diaminobenzidin (DAB) enzimszubsztrát jelöléssel és hematoxin ellenfestéssel ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc.) használatával történt. A festett erekről mikroszkópos képeket készítettünk Zeiss Axio Imager rendszerrel (Zeiss, Oberkochen, Németország). ImageJ programmal [National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MA, USA]; és a teljes szövetfelelőlet százalékában adtuk meg az érfal intima és média rétegeiben a pozitívan festődő területeket.

3.3.2. Gracilis arteriolák nyomás angiometriás mérése (2A modellben)

A korai PCOS modellben 10 hetes kezelést követően az állatokat elaltattuk (Nembutal 45 mg/kg i.p.), vérnyomásukat a carotis artéria direkt kanülálásával mértük. Az iliofemorális régió megnyitását követően az in vivo ~150 μm átmérőjű, m. gracilis vérellátásáért felelős arteriolákat eltávolításuk után nKR-oldatot tartalmazó szervfürdőbe helyeztük. Az arteriolát mindkét végén műanyag mikrokanüllel kanüláltuk és in vivo hosszára kifeszítettük. Mindkét kanül nyomás-szervopumpákhoz (Living System, Burlington, VT, USA) csatlakozott és az arteriolákban áramlásmentes állapotban 50 Hgmm intraluminális nyomást hoztunk létre. A mérőeszköz és a mérés menete hasonló volt a korábban leírtakhoz.

A gracilis arteriolákon 50 Hgmm-es nyomáson, oxigenizált nKR-oldatban 30 perc inkubációt követően egyensúlyi átmérőket mértünk. Ezután 10 perces 10^{-6} M/L noradrenalin (NA)

inkubáció következett; a kialakult NA-kontrakciót is megmértünk. Ezt követően dózis-hatás (átmérő) görbéket rögzítettünk 30, 60, 120, 240 és 600 mU/mL inzulin jelenlétében is, minden dózisnak 8 perc inkubációt hagyva a stabil átmérők kialakulásához. Öblítést követően, ismételtén 10^{-6} M/L NA-t adtunk a szervfürdőhöz. 50 Hgmm-en, 10 perc inkubáció után 10^{-6} M/L ACh adtunk a szervfürdőhöz, majd 20 perc inkubáció után a külső és belső átmérőket megmértük. Ezt követően 10^{-5} M/L L-NAME-et adva a rendszerhez, 25 perc inkubációs idő és 50 Hgmm nyomáson az egyensúly beállítását követően ismét átmérőket mértünk. Végül kimosást követően Ca^{2+} -mentes oldatban 20 perces inkubáció után megmértük a passzív átmérőt, teljesen relaxált egyensúlyi állapotban. A prekontrahált szegmensek inzulin-indukált relaxációját a NA-indukált prekontrakcióra normalizáltuk: $(R_{\text{Ins}} - R_{\text{NE}}) / R_{\text{NE}}$. Hasonló módon az ACh-relaxációt és az L-NAME hatását is a NA-prekontrakcióhoz viszonyítottuk.

3.3.3. Thoracalis aortaringek ex vivo farmakológiai reaktivitása (2A modellben)

A mellkas megnyitását követően az állatokat transzkardiálisan 10 mL heparinizált (10 NE/mL) nKR-oldattal perfundáltuk, ezt követően a szív és az aorta minden állatból eltávolításra került, majd a szívek súlyát megmértük. A thoracalis aorta (TA) disztális szakaszának izolálása után négy gyűrűt preparáltunk, majd 95% O_2 és 5% CO_2 karbogén gázelegy (Lindogas) keverékével buborékolatott nKR-oldatot tartalmazó szervfürdőbe helyeztük. Az összes csoportból 3 mm hosszú TA-szegmenseket myográf (610-M Multi Myograph System, Danis Myo Technology) rozsdamentes acél értartóira (200 μm átmérő) helyeztük. A kád 37°C -os volt és a TA-ringek nyugalmi feszülését 15 mN értékre állítottuk be (4. ábra) [67, 68].



4. ábra: Myográf (610-M Multi Myograph System, Danis Myo Technology)

A szegmenseken 124 mM/L koncentrációjú K^+ referencia kontrakciót követően 20 perces inkubációval 5×10^{-8} M/L NA prekontrakciót alkalmaztunk és az endotheliális relaxáció vizsgálatára 10^{-8} - 10^{-5} M/L acetil-kolin dózis-hatás görbét vettünk fel. Ugyancsak 5×10^{-8} M NA-nal prekontrahált aorta ringeken értékeltük az ösztadiol vazorelaxációt indukáló hatását (10^{-5} - 10^{-4} M ösztadiollal). Más ringeken az 5×10^{-8} M/L NA-prekontrakció után az inzulin-mediált vazorelaxációt emelkedő dózisú (50-150-300-600 mU/mL) inzulin adásával vizsgáltuk. Ezt követően a lehetséges, eltérő relaxációs útvonalak vizsgálatához az érgyűrűket vagy 10^{-4} M/L indometacin vagy 10^{-4} M/L L-NAME jelenlétében 20 percig inkubáltuk, majd az inzulin dózis-hatás mérést megismételtük. Az indometacin gátolja az összes prosztanoid szintézisét (beleértve a prosztaciklin és thromboxán szintézisét is), az L-NAME mindhárom formájú NO-szintáz általános gátlószere. A mérések között nKR oldattal átmostuk a szervfürdőket és 20 perces nyugalmi időszakot biztosítottunk. Az aorta relaxációt stabil kontrakció-plató elérését követően vizsgáltuk. A relaxáns választ a NA-indukált prekontrakció százalékában adtuk meg.

A TA-szegmensek izometriás feszülését MP100 rendszer segítségével rögzítettük, majd a felvett adatokat Acq-Knowledge 3.7.3 programmal (Biopac Systems) értékeltük ki. A vazoaktív anyagokat fiziológiás sóoldatban (0,9 v/v% NaCl) oldottuk fel. A NO-függő vazorelaxációt az inzulin-indukálta direkt és az L-NAME-gátolt relaxációk relatív különbségeként számítottuk.

3.3.3.1. Szövettan és szövettani mérések (2A modellben)

PCOS modellünkben az ovariumok és az aorta szegmensek formaldehid-fixálást és hematoxin-eozin festést követően szövettani vizsgálatra kerültek. A DHT -kezelt csoportokban policisztás petefészek morfológia mutatkozott, míg a kontroll csoportban normál ovariumokat azonosítottunk, mely eredmény összhangban állt a korábban Manneras és mtársai, valamint Yanes és mtársai által publikáltakkal [51, 67]. A méréseket Panoramic Viewer programmal végeztük (3D Histech, Budapest, Magyarország).

3.3.4. Arteria saphena - krónikus hormonhiány és hormonpótlás hatása az akut ösztradiol relaxációra (3A modellben)

Nőstény Sprague-Dawley patkányok két csoportját hasonlítottuk össze. Az O-csoportban (ovarietomizált) pentobarbitál (45 mg/tskg, i.p.) anesztéziában eltávolítottuk az ovariumokat. Az E-csoportban szintén ovarietomiát hajtottunk végre és emellé ösztradiol-propionátot (Richter, Budapest, Magyarország; 450µg/tskg i.m., hetente) alkalmazva ösztradiol (E) kezelésben részesültek. 5 hetes krónikus kezelést követően pentobarbitál anesztézia során a bal a. saphenát izoláltuk és a korábban leírtaknak megfelelően nKR oldatban szervfürdőbe helyeztük és mikroangiometriás rendszerben vizsgáltuk, stabil pH és hőmérséklet mellett [68]. Az intraluminális nyomást 50 Hgmm tartottuk, 30 perces inkubációt követően szintén maximális noradrenalin (Arterenol, Hoechst) kontrakciót hoztunk létre. Miután kifejlődött a stabil kontrakció (10 perc) emelkedő koncentrációban (1-100 µM) 17-β-ösztradiolt (Richter) adtunk a rendszerhez, 10 percenként kumulatív módon emelve a dózist. Ezen kívül az ovarietomizált és ovarietomizált, E-kezelt állatok egy részének erein in vitro kumulatív koncentráció görbéket vettünk fel, megvizsgálva a papaverin (Papaverin HCL, Chinoi, Budapest, 1 nM-100µM) illetve a nifedipin (EGIS, Budapest, Magyarország; 3 nM-100µM) hatásait hasonlóan noradrenalin-előfeszített saphena artériákon [69]. A relaxációs hatást a noradrenalin kontrakció százalékában fejeztük ki (maximális kontrakció NA-nal = 0% relaxáció, nKR-oldatban mért érték = 100% relaxáció). Az eredményeket a korábbiakban leírtaknak megfelelően értékeltük ki.

3.3.5. Vena saphena in vitro kontraktilitása (3A, 3B modellben)

A krónikus kezelést követően az állatok bal v. saphenája eltávolításra került. A 8-12 mm hosszú vénás szegmensek eltávolításuk után nKR-oldatot tartalmazó mikroangiometriás szervfürdőbe kerültek. Az érszegmenseket mindkét végükön üvegkanülökre helyeztük, majd

az axiális hosszukat az eltávolítás előtti in vivo hosszra állítottuk be [70]. A rendszer, a mérés és az adatrögzítés az előzőekben leírtaknak megfelelően történt, ki és bemeneti nyomáskontroll mellett, az érátmérők automatikus rögzítésével, 37 °C fokon tartott, oxigenizált és pH kontrollált normál Krebs-Ringer oldatban.

Először a vénaszegmenseket 8 Hgmm-es intraluminális nyomáson 30 percig inkubáltuk normál Krebs-Ringer-oldatban (nKR). Az ekvilibrációs periódus után az intraluminális nyomást 1 Hgmm/s sebességgel folyamatosan változtattuk 0-30-0 Hgmm között egymást követő ciklusokban. Intraluminális nyomás-átmérő jelleggörbéket regisztráltunk három nyomáscikluson keresztül. A biomechanikai számításokhoz minden esetben a harmadik ciklus görbéjének felszálló szárát használtuk. Nyomás-átmérő görbéket először nKR-oldatban regisztráltunk (spontán tónus). Ezután a fürdőbe 16 μ M noradrenalin (Arterenol, Hoechst) adtunk. Tíz perc ekvilibráció után újabb három ciklust regisztráltunk (maximális NA kontrakció). A noradrenalin kimosása után a fürdőbe 28 μ M papaverint tettünk (Papaverin hydrochloricum, Chinoïn), és harminc perc ekvilibráció után a három ciklust megint megismételtük (teljes relaxáció).

A mechanikai és farmakológiai paramétereket az előzőekben leírtaknak megfelelően számítottuk.

3.4. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis során az in vitro mért paraméterekhez egy és két-szemponjú ANOVA-t, illetve a nyomás-átmérő és a kumulatív koncentráció-átmérő görbék statisztikai analíziséhez repeated measures ANOVA-t, post hoc tesztként Tukey- és Newman-Keuls teszteket alkalmaztunk, szignifikáns eltérésnek $p < 0,05$ értéket fogadtuk el, az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg.

4. Eredmények

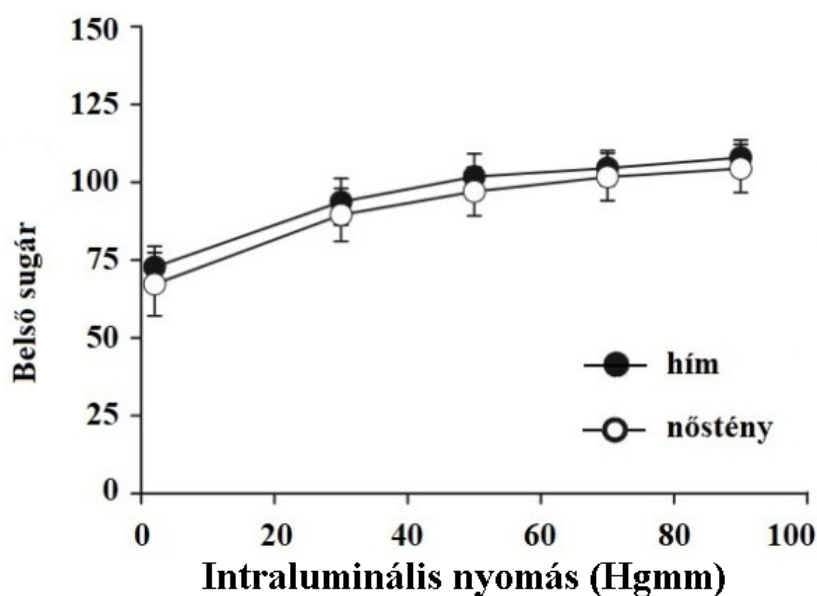
4.1. Normotóniás állatok koszorúserein mért nemi különbségek (1A modell)

4.1.1. Kiemelendő biológiai paraméter

A szív súly/ testsúly hányadosban nem mutatkozott nemi különbség: $3,2 \pm 0,2$ mg/g nőstények esetén, $3,3 \pm 0,1$ mg/g hímek esetén.

4.1.2. Nemi különbségek a coronaria rezisztencia arteriola geometriában

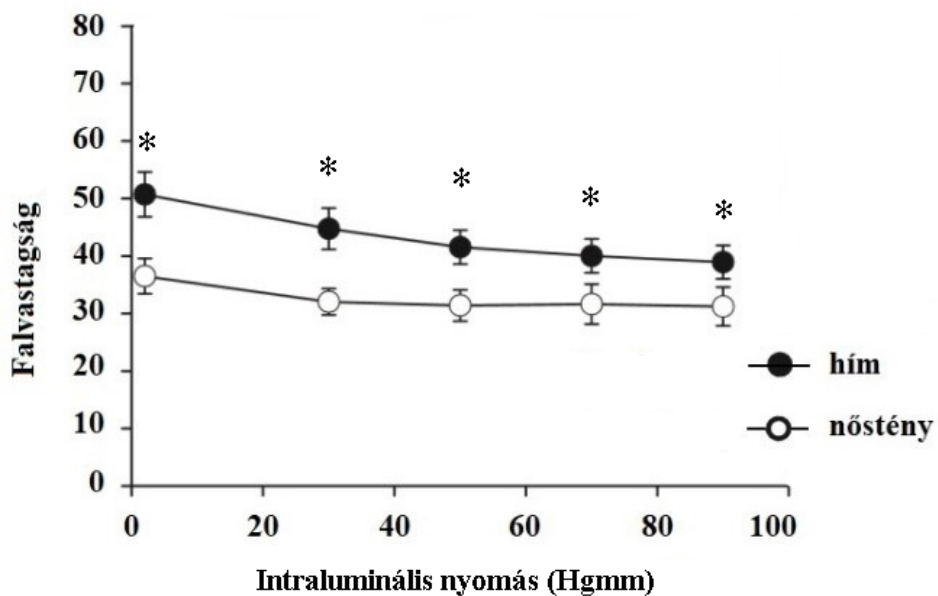
A hím arteriolák belső sugarában nem mutatkozott szignifikáns különbség sem nKR (5. ábra, ns.), sem Ca^{2+} -mentes oldatban a nőstények értékeihez képest.



5. ábra: Belső érsugár (μm) normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban nKR oldatban

Ezen eredményünk azt mutatja, hogy sikeresen preparáltunk közel azonos morfológiai tulajdonságokkal rendelkező hím és nőstény rezisztencia arteriolákat.

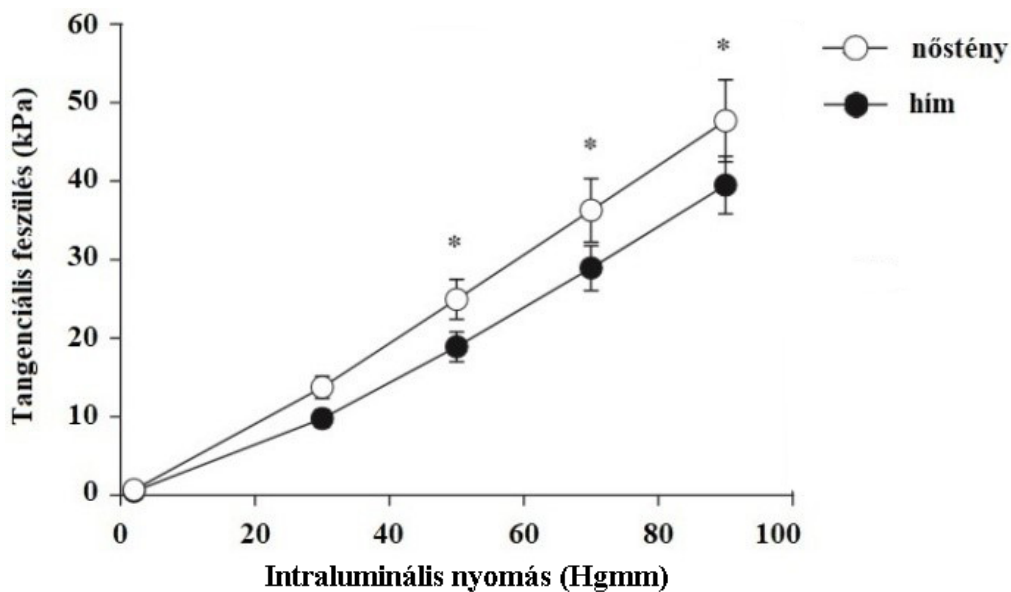
Mivel hím és nőstény erek, nem teljesen azonosak a geometriai jellemzők, amit az is mutat, hogy a hím erek szignifikánsan vastagabb falúak voltak (6. ábra, * $p < 0,01$).



6. ábra: Falvastagság (μm) normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban nKR oldatban

4.1.3. Nemi különbségek a coronaria arteriolafal elaszticitásban

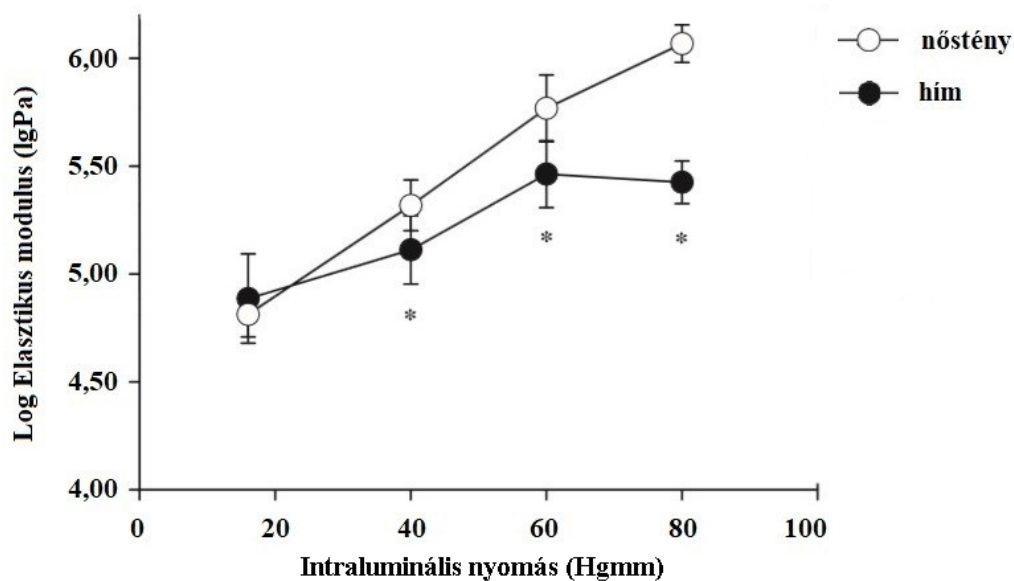
Ugyanolyan belső sugár és emelkedett falvastagság kisebb falfeszülést eredményezett hímeiben passzív körülmények között (7. ábra, * $p < 0,01$), és nKR oldatban is.



7. ábra: Tangenciális falfeszülés az intraluminális nyomás függvényében, kalciummentes oldatban, normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban

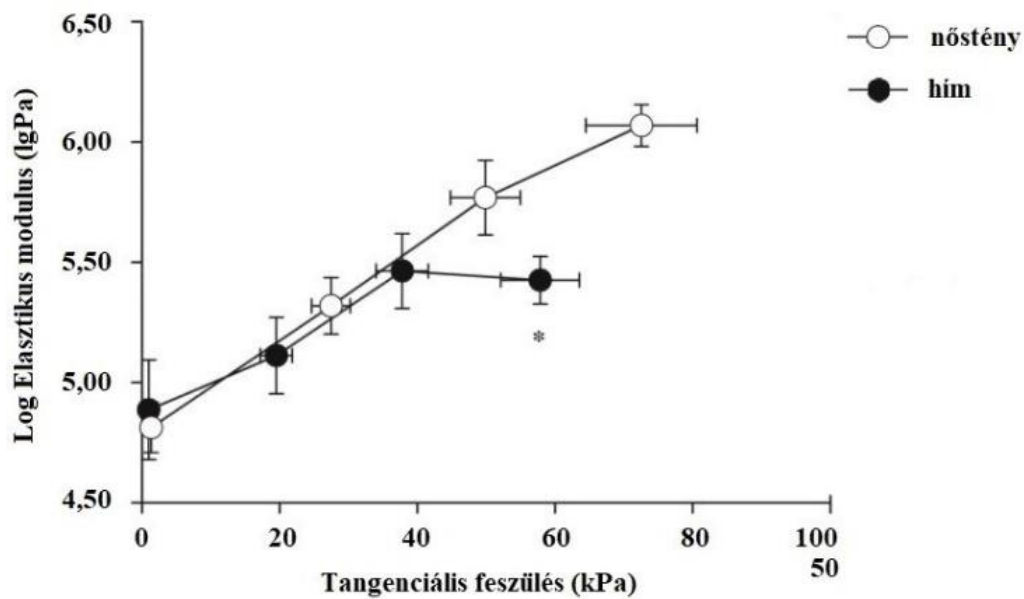
A disztenzibilitás szignifikánsan nagyobb hímeiben ($0,03442 \pm 0,0059 \text{ kPa}^{-1}$ vs. $0,0153 \pm 0,0036 \text{ kPa}^{-1}$ $p=50 \text{ Hgmm}$ -es nyomáson, * $p < 0,05$).

A hím erek izobárikus elasztikus modulusa kisebb 30 Hgmm felett (log elasztikus modulus $5,4 \pm 0,1$ kPa vs. $5,8 \pm 0,1$ kPa 50Hgmm-en hímeknél a nőstényekhez képest (8. ábra, * $p < 0,01$).



8. ábra Az elasztikus modulus az intraluminális nyomás függvényében, kalciummentes oldatban, normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban

A hím erek elasztikus modulusa a falfeszülés függvényében is kisebb volt (9. ábra, * $p < 0,05$) az identikus pontok azonos nyomáson mért falfeszülést és elasztikus modulust jelölnek,

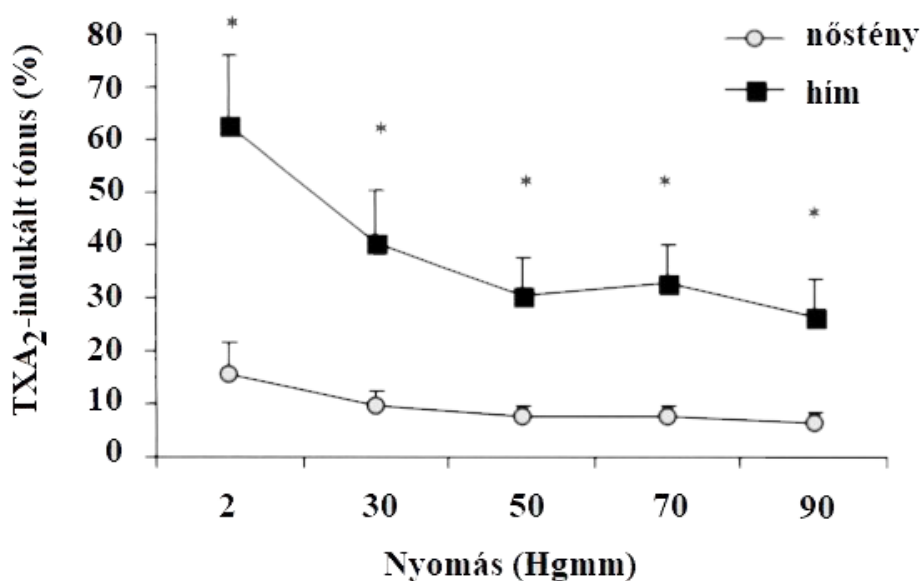


9. ábra: Az elasztikus modulus a tangenciális falfeszülés függvényében, kalciummentes oldatban, normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban

4.1.4. Nemi különbségek a coronaria arteriolák kontraktilitásában és endothel funkciójában

A coronaria artériolák spontán tónusában a hímek és a nőstények között nem találtunk szignifikáns különbséget. (hímekben $9,8 \pm 2,8$ % vs. nőstényekben $10,8 \pm 2,6$ % 50 Hgmm-en).

Markáns különbség mutatkozott a TXA_2 -indukálta tónusban (10. ábra, * $p < 0,001$). A hím rezisztencia erek kontraktilis válasza szignifikánsan nagyobb.



10. ábra: TXA₂ indukálta értónus normális vérnyomású hím és nőstény patkányokban

A BK-indukálta endotheliális dilatáció nem mutatott nemi különbséget. ($8,1 \pm 2,3\%$ vs. $7,7 \pm 2,0\%$ $p=50$ Hgmm-en).

4.2. A hipertóniás adaptációs változások nemi különbségei koszorúsereken (1B modell)

4.2.1. Biológiai paraméterek

Az artériás középnyomásban (MABP) nem mutatkozott szignifikáns különbség a nemek között (nőstények: 131 ± 5 Hgmm, hímek 134 ± 7 Hgmm). Azonban szignifikáns vérnyomás növekedés következett be a normotóniás állatokhoz viszonyítva [71].

A szív relatív súlya – testsúlyra normalizálva nagyobb volt hipertóniás nőstényekben, mint hipertóniás hímekben (3. táblázat).

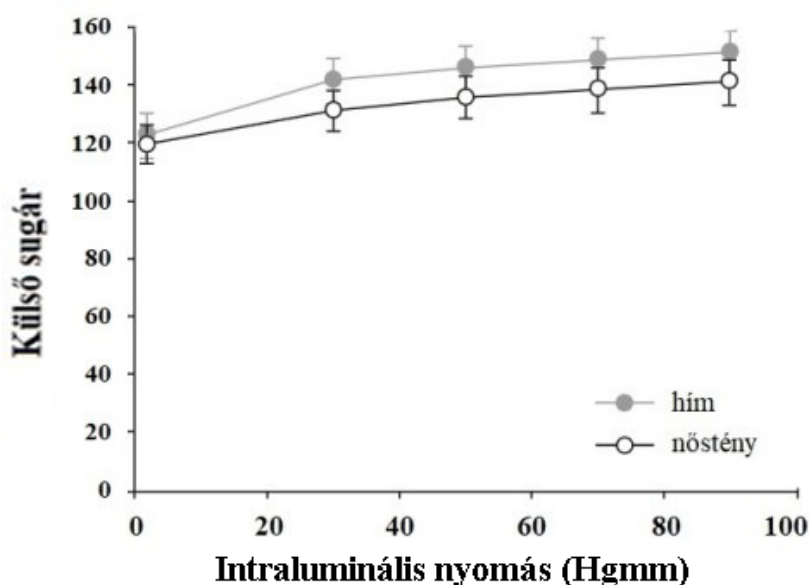
3. Táblázat: Egyedül a nőstényekben volt szignifikáns szívsúly index emelkedés. A hipertóniás nőstények relatív szívsúlya nagyobb volt, mint a hipertóniás hímeké. A szívsúly index a szív relatív tömege 100 gramm testsúlyra számolva, $*p < 0,001$.

3. táblázat: Szívsúly index és vérnyomás változás nemi különbségei ATII hipertóniában

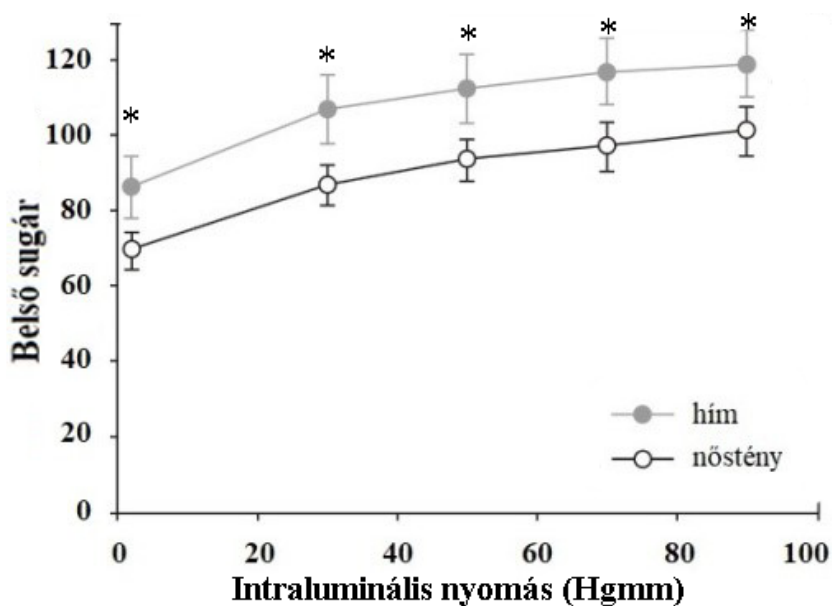
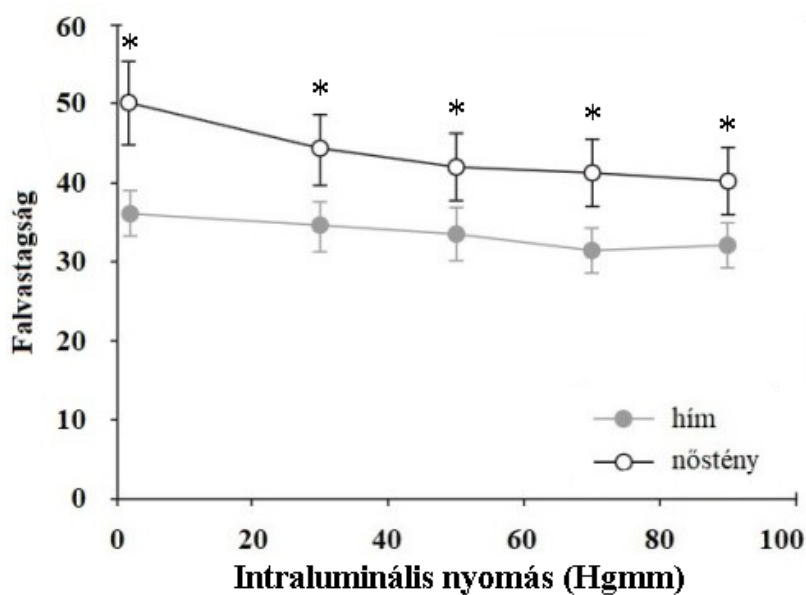
Mért paraméter	ATII-kezelt nőstények	ATII-kezelt hímek
Vérnyomás (Hgmm)	131±5	134±7
Szívsúly, g/100 g testsúly	0,387±0,009*	0,306±0,006

4.2.2. Nemi különbségek hipertóniában a coronaria rezisztencia arteriola geometriában

A külső sugár nem mutatott nemi különbséget (11. ábra), azaz morfológiailag hasonló szegmenseket sikerült preparálni. Hipertóniás nőstényekben szignifikánsan kisebb volt a belső sugár (12. ábra, * $p<0,05$), valamint szignifikánsan nagyobb a falvastagság (13. ábra, * $p<0,05$) kalciummentes oldatban a hímek ereihez képest.



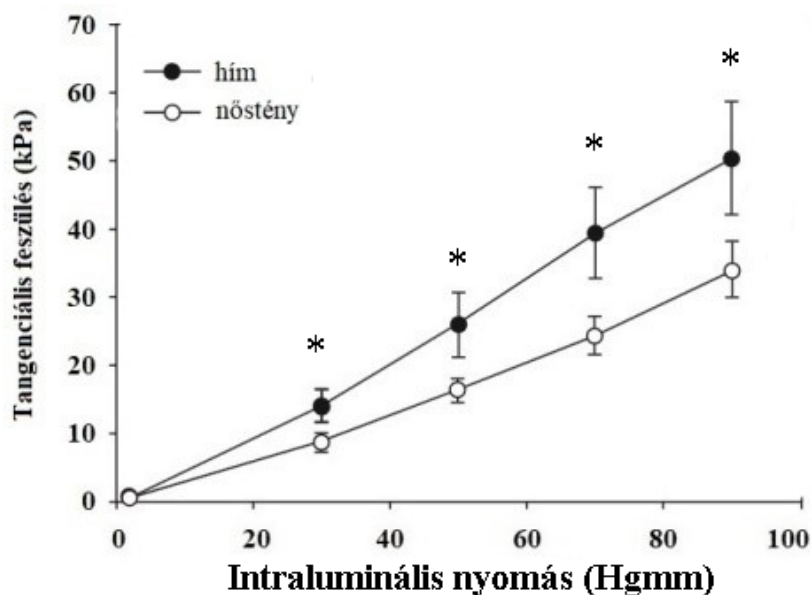
11. ábra: külső sugár (μm)

12. ábra: belső sugár (μm)13. ábra: Falvastagság (μm)

Nem találtunk szignifikáns különbséget a nemek között a falkeresztmetszet értékekben (hímekben $23,431 \pm 3,541 \mu\text{m}^2$ vs. nőstényekben $27,074 \pm 4,537 \mu\text{m}^2$, ns.).

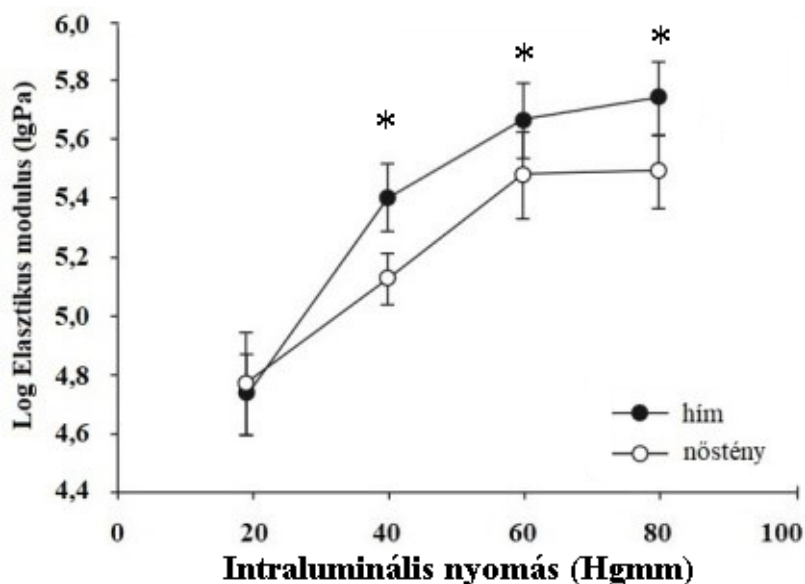
4.2.3. Nemi különbségek az erek biomechanikájában

Az erek mechanikai terhelése és a tangenciális falfeszülés szignifikánsan nagyobb volt hímeiben, mint nőstényekben (14. ábra, * $p < 0,01$)



14. ábra: Nemi különbségek ATII hipertónia hatására patkányokban a koszorúsereken mérhető tangenciális feszülésben (Ca^{2+} -mentes-oldatban)

Nem volt megfigyelhető nemi különbség a disztenziabilitásban (a hímekben $0,0295 \pm 0,0089 \text{ kPa}^{-1}$ vs. a nőstényekben $0,0288 \pm 0,0079 \text{ kPa}^{-1}$ Ca^{2+} -mentes oldatban 50 Hgmm-en). A hímekből származó erek elasztikus modulusa szignifikánsan nagyobb volt (15. ábra, * $p < 0,05$), mint a nőstényekből származóké.



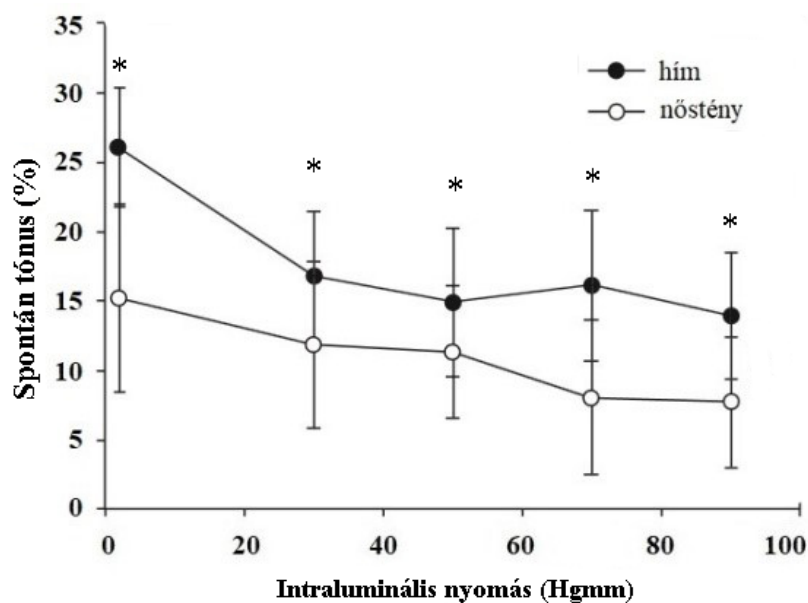
15. ábra: Nemi különbségek ATII hipertónia hatására patkányokban a koszorúserek elasztikus modulusában (Ca^{2+} -mentes-oldatban)

Összevetve korábbi eredményeinkkel, a tangenciális falfeszülés és az inkrementális elasztikus modulus normotenzív hímekben szignifikánsan kisebb volt, mint normotenzív nőstényekben.

Ez az érfali mechanikai kompenzáció esett ki, illetve fordult ellentétes irányba ATII hipertónia hatására.

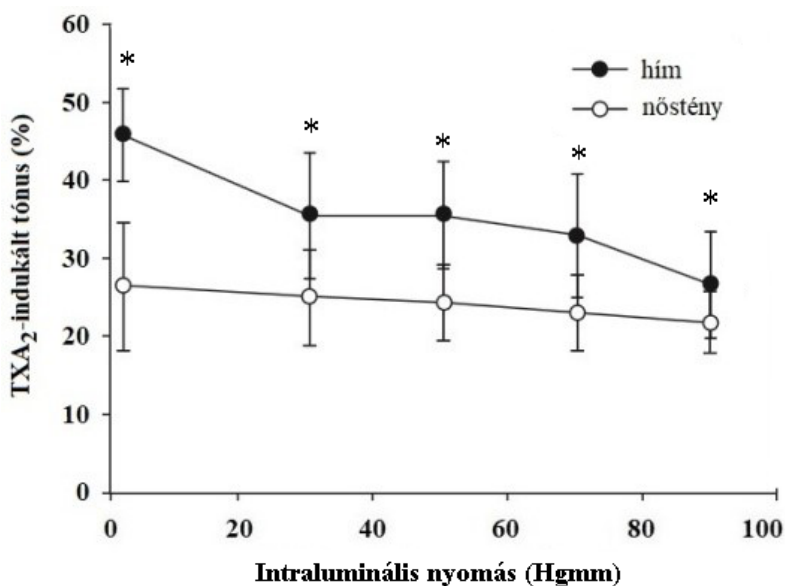
4.2.4. Nemi különbségek a hipertóniás erek kontraktilitásában

A hímekből származó erek spontán tónusa (16. ábra, * $p < 0,05$) szignifikánsan nagyobb volt, mint a nőstényekből származóké.



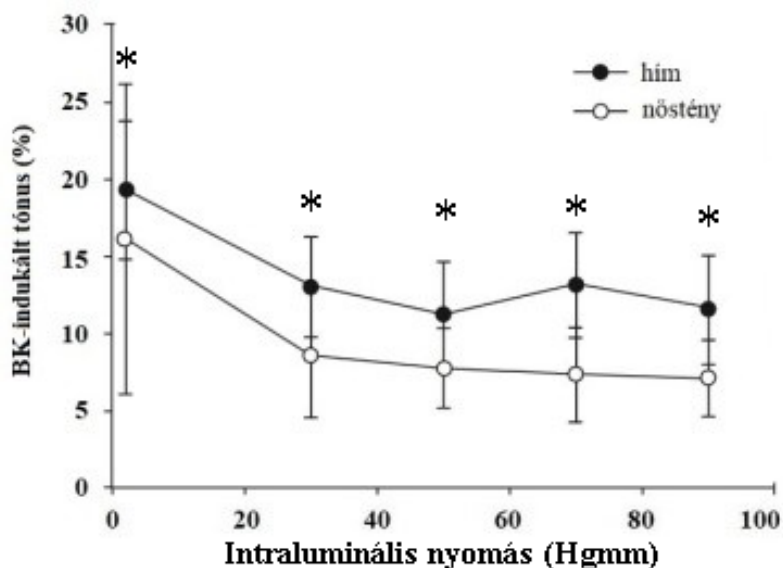
16. ábra: Nemi különbségek ATII hipertónia hatására patkányokban a koszorúserek spontán értónusában

A TXA₂-indukált értónus, azaz a vazokonstrikció is szignifikánsan nagyobb volt a hím coronaria arteriolákban (17. ábra, * $p < 0,05$)



17. ábra: Nemi különbségek ATII hipertónia hatására patkányokban a koszorúserek TXA₂-indukálta értónusában

A Ca²⁺-mentes oldatban létrejött maximálisan relaxált állapothoz viszonyítva a BK-indukálta értónus szignifikánsan nagyobb, azaz a relaxáció mértéke kisebb volt hímeiben (18. ábra, * p<0,05). Ennek megfelelően BK hatására a nőstényekből származó erek nagyobb mértékben relaxáltak, mint a hímeiből származók.



18. ábra: Nemi különbségek ATII hipertónia hatására patkányokban a koszorúserek BK-indukálta értónusában

Korábbi eredményeinkkel összevetve a spontán értónus és a BK-indukálta tónus nem mutatott szignifikáns különbséget a normotenzív hímek és a normotenzív nőstények között. Ellenben a

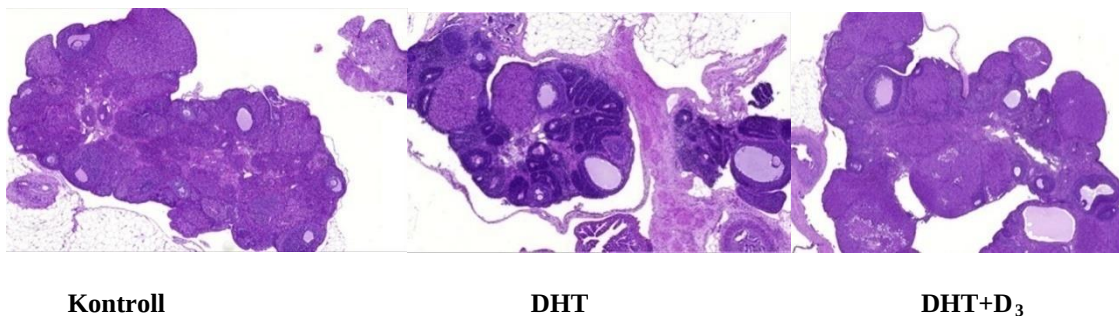
TXA₂-indukálta tónus már normotenzív hímekben is szignifikánsan nagyobb volt, mint normotenzív nőstényekben. Azaz ATII hipertónia hatására a hímek fokozott TXA-függő kontrakciós válasza megmaradt, ugyanakkor nőtt a spontán értónusuk és csökkent a relaxációs válaszuk, azaz a vazokonstrikcióval szemben minden irányban sérülékenyebbé váltak a nőstényekhez képest.

4.3. D-vitamin kezelés hatása hiperandrogén állapotban (2A modell)

4.3.1. Általános fiziológiai és laborparaméterek (2A modell)

Az artériás középnyomás 122 ± 3 , 123 ± 6 és 123 ± 4 Hgmm volt a kontroll, a DHT-kezelt és DHT+D₃-kezelt csoportokban (nem szignifikáns). Az átlagos testsúly a két DHT-kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollban. A két DHT-kezelt csoport között nem volt különbség (kontroll: 298 ± 8 g, DHT: 354 ± 16 g, DHT+D₃: 353 ± 9 g).

A szövettani vizsgálatok alapján policisztás ovariumok alakultak ki a DHT-kezelt csoportokban és normál ovarium morfológia a kontroll csoportban. A periférián számos éretlen folliculus valamint a domináns tüszők hiánya mutatkozott a DHT-kezelt csoportokban. A folliculus átmérők szignifikánsan kisebbek voltak a DHT-kezelt ovariumokban, mint a kontroll csoportban (1609 ± 617 és 2334 ± 451 pixel 40x nagyításon, 19. ábra, $p<0,05$). A DHT+D₃-csoport ovariumaiban található folliculusok átmérője és a másik két csoport értékei között nem volt szignifikáns különbség (2054 ± 442 pixel).



19. ábra: Reprezentatív HE-festett ovarium metszetek képei csoportonként (10x)

A DHT és DHT+D₃-kezelt csoportokban az ovarium policisztás morfológiát mutatott.

Az éhomi és a 120 perces vércukor és inzulin szintek a 4. táblázatban láthatók.

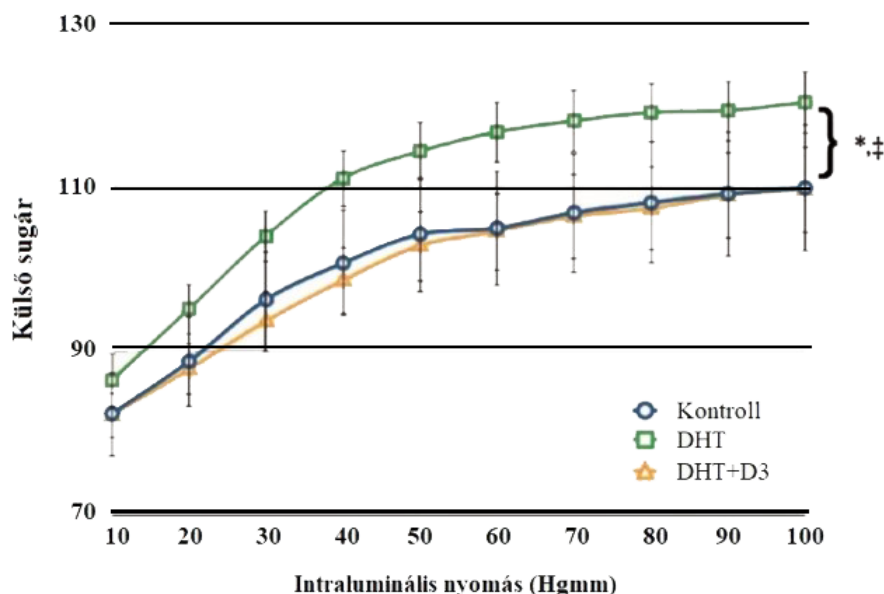
4. táblázat: A 120 perces inzulin érték a DHT-csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll csoportban (* $p<0,01$). D-vitamin kezelés normalizálta az OGTT alatti inzulin választ (§ $p<0,001$). Egyéb cukoranyagcsere paraméterben nem volt szignifikáns különbség: vércukor 0', 120', inzulin 0' és glikált fehérje szint. A DHT szint a DHT-kezelt csoportokban szignifikánsan magasbb volt ($p<0,05$).

	Kontroll (n=10)	DHT (n=10)	DHT+D₃ (n=10)
Vércukor 0' (mM/L)	5,31±0,15	5,35±0,24	5,18±0,27
Vércukor 120' (mM/L)	6,11±0,11	6,36±0,2	7,09±0,13
Inzulin 0' (ng/mL)	0,42±0,02	0,42±0,03	0,45±0,04
Inzulin 120' (ng/mL)	0,71±0,14	1,42±0,33 *	0,48±0,07‡
Glikált fehérje (Fruktózamin, mM/L)	157±3	151±4	156±4
DHT plazmaszint (pg/mL)	267,3±14,1	370,9±35,0 *	438,4±24,1 †

A vércukorszintekben és az éhomi inzulin szintben nem volt különbség a vizsgált csoportok között. Szignifikáns különbséget találtunk a 120 perces inzulin értékben. DHT-kezelt állatoknak magasabb plazma inzulin szintjük volt, mint a kontroll állatoknak és ezt a különbséget a D₃-vitamin-kezelés megszüntette, rendezte. A glikált fehérjék szintjében nem volt különbség.

4.3.2. Gracilis arteriola geometria (2A modell, a. gracilis)

A DHT-kezelés növelte a relaxált külső (20. ábra, * $p<0,05$, Ca²⁺-mentes oldatban mérve), és belső sugarat, amit az egyidejűleg alkalmazott D₃-vitamin-kezelés csökkentett (20. ábra, ‡ $p<0,05$ DHT vs DHT+D₃) a kontroll szintjére.

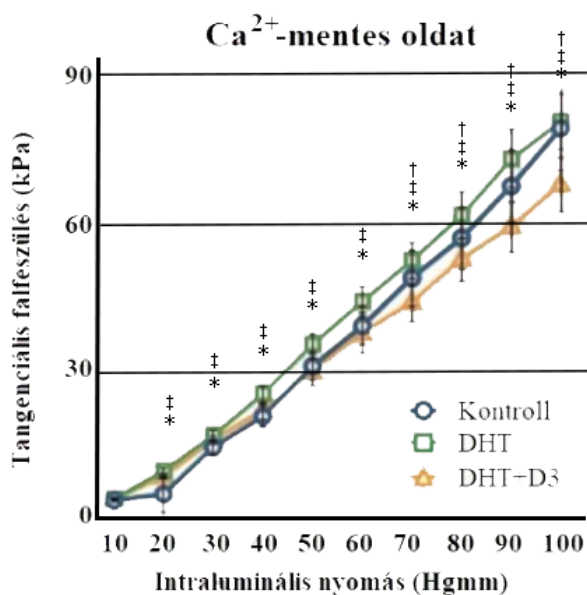


20. ábra: Külső sugár (μm) Ca^{2+} -mentes oldatban mérve nem mutatott különbséget a kontroll és a DHT+D₃ csoportban. Mindkét sugár kisebb volt, mint a DHT-kezelt állatokból izolált arteriolák sugara ($p < 0,05$). átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

A falvastagság Ca^{2+} -mentes oldatban mérve a következőképpen alakult: $20 \pm 2 \mu\text{m}$, $19 \pm 1 \mu\text{m}$ és $20 \pm 1 \mu\text{m}$ a kontroll, DHT- és DHT+D₃-kezelt csoportban (50 Hgmm-en mérve, nem szignifikáns). Ca^{2+} -mentes oldatban az érfalak keresztmetszeti területe a fenti csoportokban $12080 \pm 1627 \mu\text{m}^2$, $12542 \pm 1090 \mu\text{m}^2$ és $11348 \pm 660 \mu\text{m}^2$, szintén nem különbözött szignifikánsan.

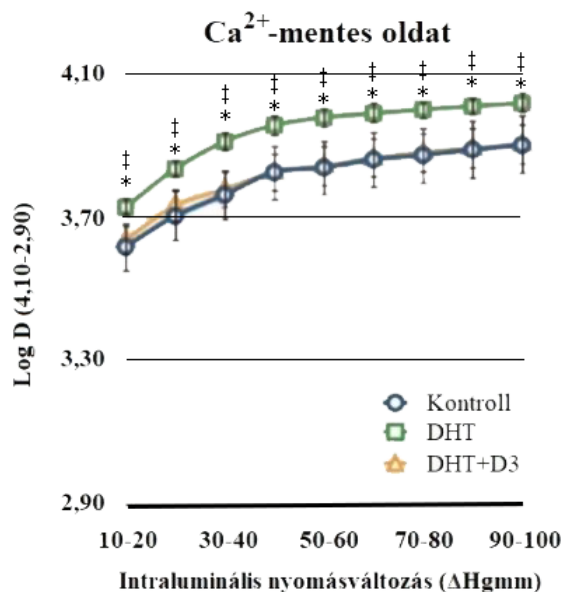
4.3.3. Gracilis arteriola elaszticitás

Az érfal mechanikai terhelése, a tangenciális falfeszülés szignifikánsan nagyobb volt a teljes nyomástartományban a DHT-kezelt csoportban a másik két csoporthoz viszonyítva Ca^{2+} -mentes oldatban (21. ábra, * $p < 0,001$). Ezt a D₃-vitamin-kezelés visszafordította, sőt, nagyobb nyomásokon túlkompenzációt eredményezett Ca^{2+} -mentes oldatban (21. ábra, ‡, †: $p < 0,001$, DHT vs. DHT+D₃ és a Kontroll vs. DHT+D₃ esetén is).



21. ábra: Tangenciális falfeszülés Ca²⁺-mentes oldatban. A tangenciális falfeszülés szignifikánsan nagyobb a DHT-csoportban, mint a másik két csoportban a teljes nyomástartományban ($p < 0,001$), 70-100 Hgmm között a feszülés a kontrollhoz képest is szignifikánsan alacsonyabb a DHT+D₃ csoportban ($p < 0,001$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

Az izobárikus disztenzibilitás szignifikánsan nagyobb volt a teljes nyomástartományban a DHT-csoportban összevetve a két másik csoporttal Ca²⁺-mentes oldatban (22. ábra, *, ‡: $p < 0,0001$). A párhuzamos D₃-vitamin kezelés hatására a disztenzibilitás a kontroll szintjére tért vissza.

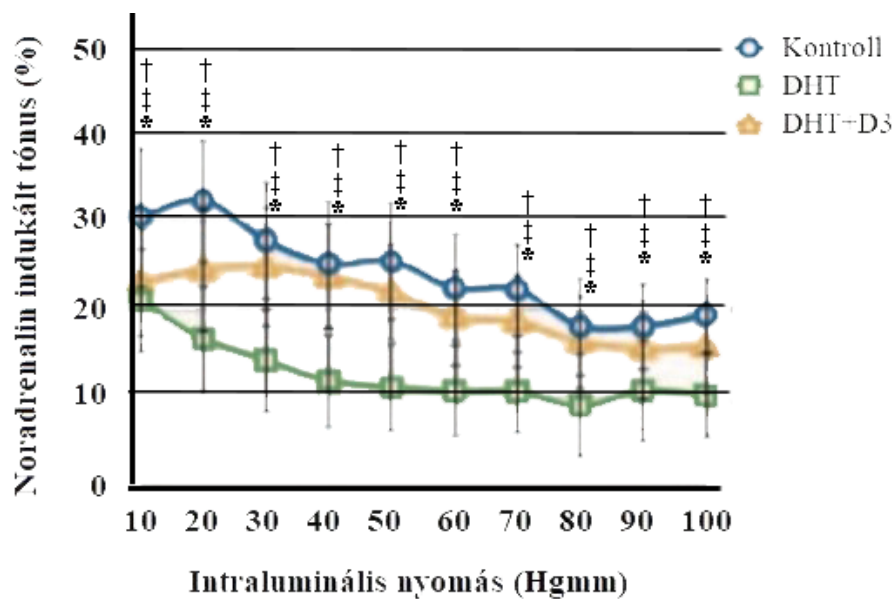


22. ábra: Disztenziabilitás Ca²⁺-mentes oldatban. A disztenziabilitás szignifikánsan nagyobb a DHT-csoportban, mint a másik két csoportban a teljes nyomástartományban (10-100 Hgmm) ($p < 0,0001$) Átlag $\pm$ SEM, *:DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, §:DHT+D₃ vs. DHT.

A DHT és D₃-vitamin kezelések nem voltak hatással a fal elasztikus modulusára (Ca²⁺-mentes oldatban, $p=50$ Hgmm-en a log elasztikus modulusok a következők voltak: $2,8 \pm 0,14$ log(kPa), $2,7 \pm 0,16$ log(kPa) és $2,4 \pm 0,11$ log(kPa) a kontroll, DHT- és DHT+D₃-kezelt csoportokban, nem szignifikáns). Nem volt szignifikáns különbség a tangenciális falfeszülés függvényében kifejezett elasztikus modulusban sem, azaz e kezdeti modellben jelentős érfal szerkezeti átépülés még nem történt.

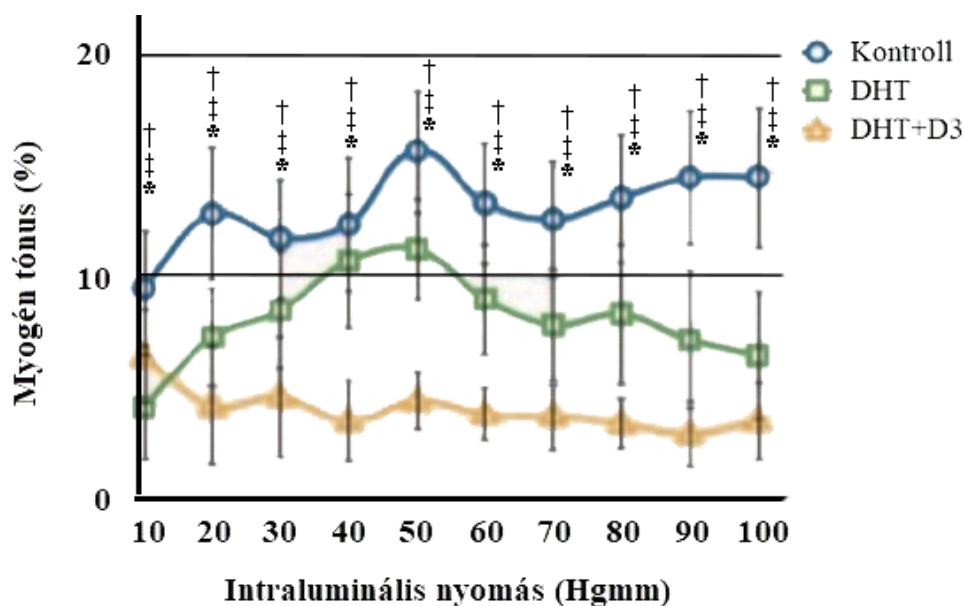
4.3.4. Gracilis arteriola farmakológiai reaktivitás

A DHT-kezelés szignifikánsan csökkentette a NA-tónust, amelyet a D₃-vitamin-kezelés majdnem teljesen helyreállított (23. ábra, *, †, § $p < 0,0001$).



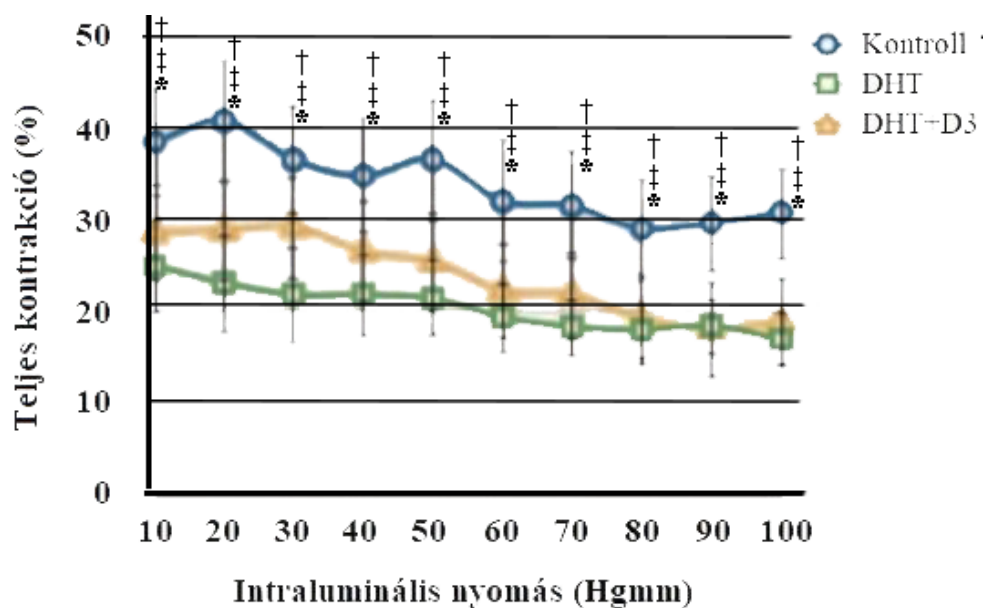
23. ábra: NA-indukált tónus (belső sugár R_i , μm) a spontán tónushoz viszonyítva nKR-ben. NA kisebb kontrakciót váltott ki a DHT-csoportban, a másik két csoporthoz viszonyítva ($p < 0,0001$). D vitamin kezelés ezt részlegesen helyreállította. Átlag $\pm$ SEM. *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT.

Ezen szegmensek jelentős myogén (spontán) tónussal rendelkeznek. A DHT-kezelést követően a tónus csökkent és érdekes módon a párhuzamos D₃-vitamin-kezelés tovább csökkentette a myogén tónust (24. ábra, *, †, ‡ $p < 0,0001$).



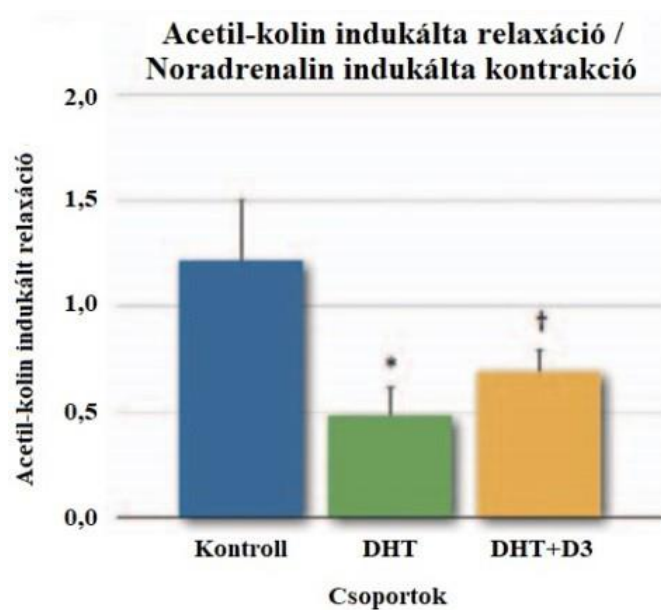
24. ábra: Arteriolák myogén tónusa. Minden csoport szignifikánsan különbözött a teljes nyomástartományban ($p < 0,0001$). A myogén tónus a legnagyobb a kontroll, a legkisebb a DHT+D₃-kezelt csoportban volt. Átlag $\pm$ SEM. *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT.

A két tónus összegzésével kapjuk meg az erek teljes farmakológiai adaptációs tartományát, melyet a DHT-kezelés szignifikánsan csökkentett, és a D₃-vitamin-kezelés részlegesen helyreállított (25. ábra, *, †, ‡ $p < 0,001$).



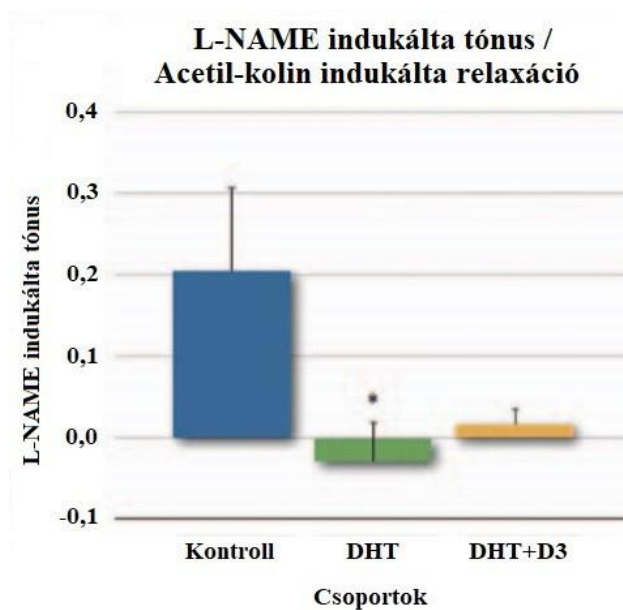
25. ábra: Az arteriolák teljes kontrakciója. Minden csoport szignifikánsan különbözött egymástól ($p < 0,001$). Átlag $\pm$ SEM. *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT.

A NA-kontrahált szegmensek 1 μ M ACh hatására kialakult relaxációja szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoportban, a DHT-kezelt csoportokhoz képest. A D₃-vitamin-kezelés ezen nem változtatott (26. ábra, *, † $p < 0,05$).



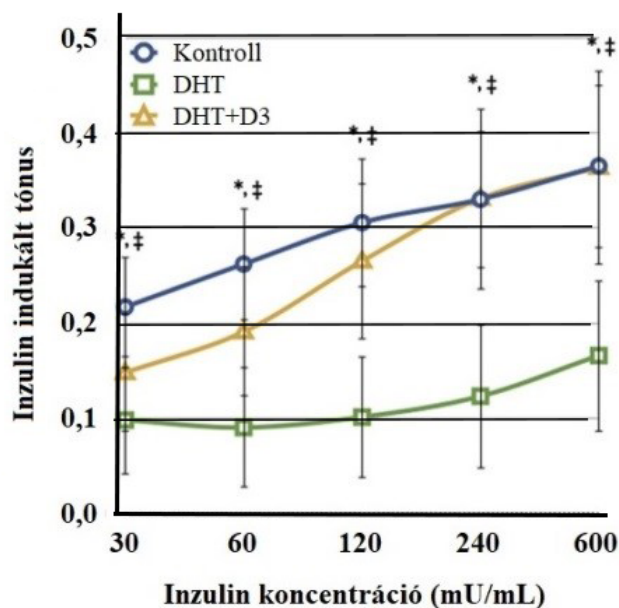
26. ábra: ACh-indukált relaxáció. Abszcissa: ACh-indukált relaxáció (10^{-6} M) a NA-indukált (10^{-6} M) kontrakcióhoz viszonyítva csoportonként (belső sugár). Az ACh-relaxáció szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoportban ($p < 0,05$). A másik két csoport közt nem volt különbség. Átlag $\pm$ SEM. *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll.

Az L-NAME jelentős kontrakciót indukált a kontroll szegmenseken, mely kontrakció hiányzott mindkét DHT-kezelt csoportban (27. ábra, * $p < 0,05$).



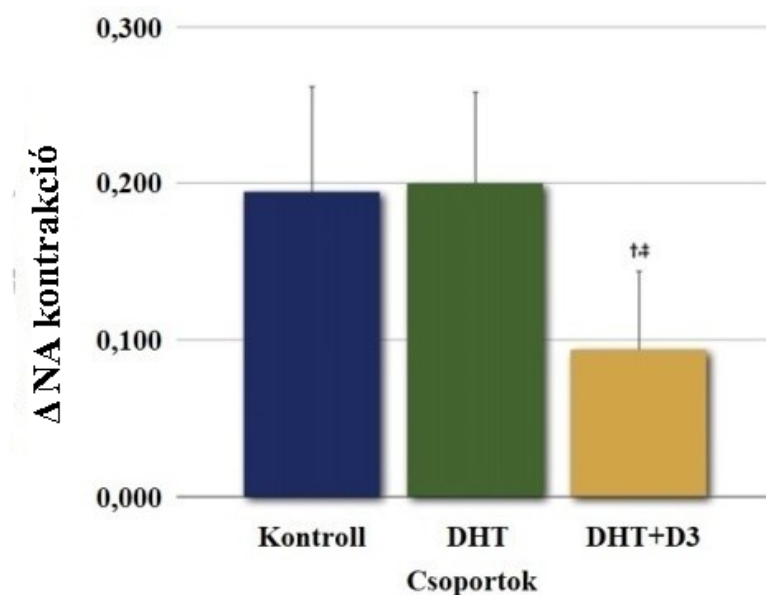
27. ábra: L-NAME-indukált (10^{-5} M) tónus ACh-indukált relaxációhoz (10^{-6} M) viszonyítva. Abszcissa: ACh-relaxációt követő NO-blokkoló L-NAME-tónus csoportonként (belső sugár). A hányados szignifikánsan nagyobb volt a kontroll csoportban, mint a DHT-csoportban ($p < 0,05$). Átlag $\pm$ SEM. *: DHT vs. Kontroll

A NA-prekontrahált gracilis arteriola szegmensekhez adott inzulin koncentráció-függő relaxációt eredményezett a kontroll állatokban. Ez a relaxáló hatás kifejezetten csökkent a DHT-kezelt állatokban (28. ábra, * $p < 0,001$). A D-vitamin-kezelés részlegesen helyreállította az inzulin-indukált relaxációt (28. ábra, ‡ $p < 0,001$).



28. ábra: Inzulin-indukált vaszkuláris tónus NA-tónushoz hasonlítva csoportonként. Abszcissa: belső sugár hányados 50 Hgmm-en. Ordináta: Elterő inzulin koncentrációk. Átlag±SEM, *p<0,001 DHT vs. kontroll ‡:p<0,001 DHT+D₃ vs. DHT

A NA-indukált kontrakciókat az egyes csoportokon belül összehasonlítva megállapítható volt, hogy az akut inzulin-adagolást követően a következő NA-kontrakció fokozódott. Ez a különbség D₃-vitamin kezelt állatokban kisebb mérvű volt (29. ábra, †, ‡ p<0,05).



29. ábra: Az első és második, inzulin-adást követő NA-indukált kontrakció különbsége a Ca^{2+} -mentes maximális relaxációhoz viszonyítva $/(R_{i\text{NA}1} - R_{i\text{NA}2}) / R_{i\text{Ca-mentes}}/$. Átlag $\pm$ SEM, †: $p < 0,05$ DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: $p < 0,05$ DHT+D₃ vs. DHT

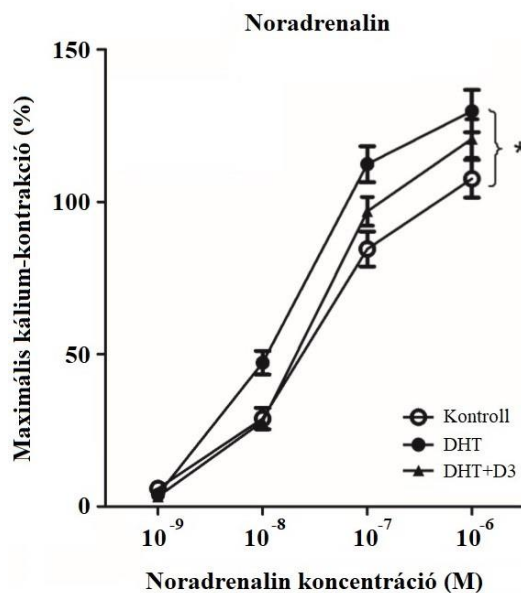
4.3.5. Aorta morfológia és farmakológiai reaktivitás (2A modell)

Az aorták szövettani eredményei ugyanolyan morfológiát mutattak mindhárom csoportban. Az aorta falvastagság értékek közt nem volt szignifikáns különbség: $113 \pm 4 \mu\text{m}$ (kontroll), $122 \pm 5 \mu\text{m}$ (DHT) és $113 \pm 6 \mu\text{m}$ (DHT+D₃).

4.3.5.1. Vazokonstriktor válasz

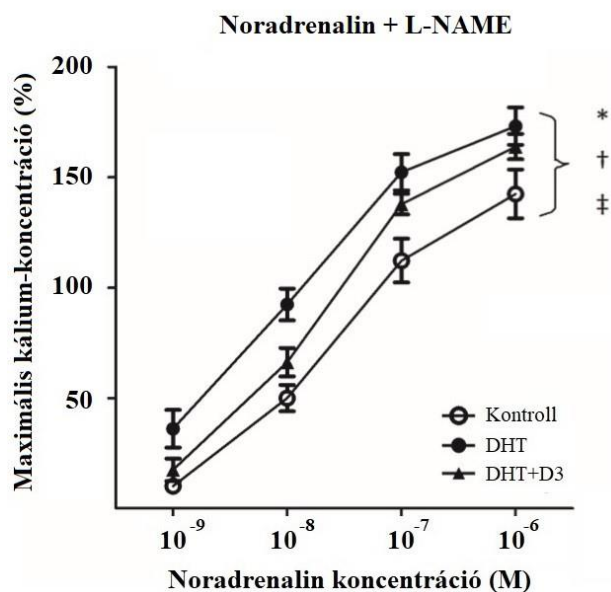
Az aorta ringek 124 mM K^+ hatására kialakuló referencia kontrakciói a három csoportban megegyeztek: $26,1 \pm 0,4 \text{ MN}$ (kontroll), $26,6 \pm 0,5 \text{ mN}$ (DHT) és $25,7 \pm 0,5 \text{ mN}$ (DHT+D₃).

A DHT-kezelt aorták esetében szignifikánsan nagyobb mérvű noradrenalin kontrakció alakult ki, mint a kontroll csoportban (30. ábra, * $p < 0,05$). $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ -vitamin (kalcitriol) kezelés csökkentette ezt a különbséget. A DHT+D₃-csoport nem különbözött szignifikánsan sem a DHT, sem a kontroll csoporttól.



30. ábra: Az erek NA-kontrakciója csoportonként (kontroll vs. DHT, * $p < 0,05$)

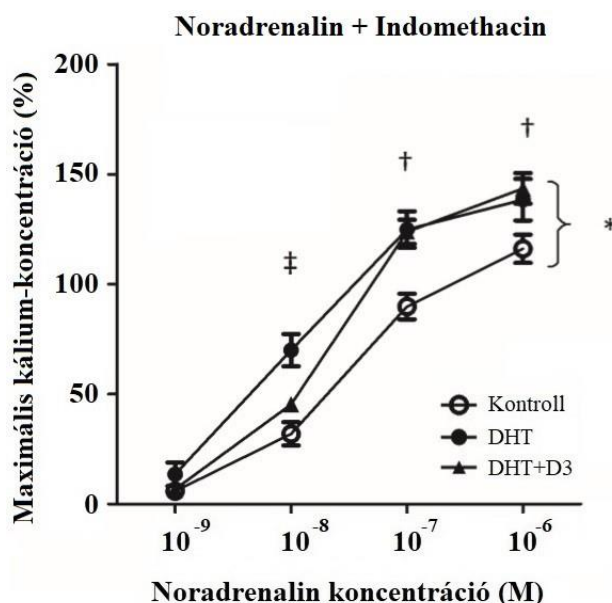
L-NAME előkezelést követő NA-kontrakciók szignifikánsan (31. ábra, * $p < 0,0001$) nagyobbak voltak a DHT-kezelt csoportokban. A kalcitriol kezelés (DHT+D₃ csoport) részlegesen csökkentett ezen a kontraktilitás növekedésén, - az értékek szignifikánsan különböznek a DHT-csoport és a kontroll csoport értékeitől (31. ábra, †, ‡ $p < 0,05$).



31. ábra: Az erek NA-kontrakciója L-NAME előkezelést követően csoportonként (kontroll vs. DHT, *: $p < 0,0001$; kontroll vs. DHT+D₃ †: $p < 0,05$; DHT vs. DHT+D₃ ‡: $p < 0,05$)

Az indometacin inkubációt követően szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és a DHT-kezelt csoportok között: a teljes dózistartományban (32. ábra, * $p < 0,05$) erősebb kontrakció

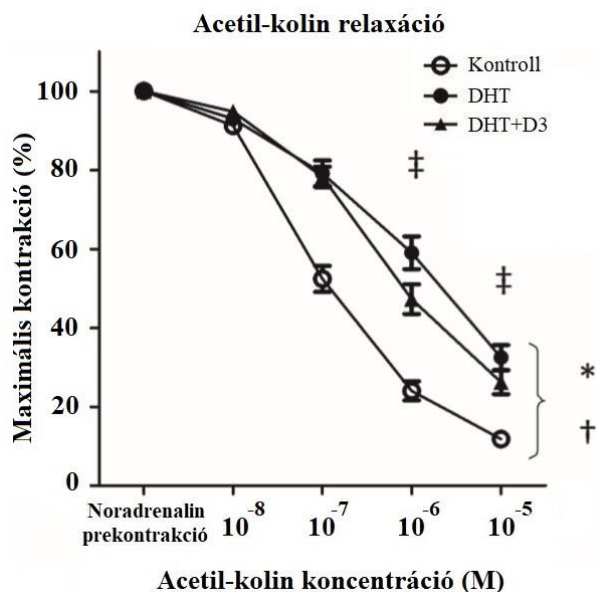
látható a DHT-csoportban. Kalcitriol kezelés szignifikánsan gátolta a kontraktilitás-fokozódást kis NA dózisok esetében (10^{-9} - 10^{-8} M), azonban nagy NA-koncentrációk esetében hatástalannak bizonyult. Alacsony NA-koncentrációknál a DHT+D₃ csoport görbéje megközelítette a kontroll csoport görbáját és szignifikánsan különbözött a DHT csoport görbájától (32. ábra, * $p < 0,05$), míg nagyobb NA-koncentrációk esetében a DHT+D₃ görbe hasonló volt a DHT görbéhez, és mindkét görbe szignifikánsan különbözött a kontroll csoporttól (32. ábra, ‡, † $p < 0,05$).



32. ábra: Az erek NA-kontrakciója indometacin előkezelést követően csoportonként (kontroll vs. DHT, * $p < 0,05$; DHT vs. DHT+D₃ ‡: $p < 0,05$; kontroll vs. DHT+D₃ † $p < 0,05$;)

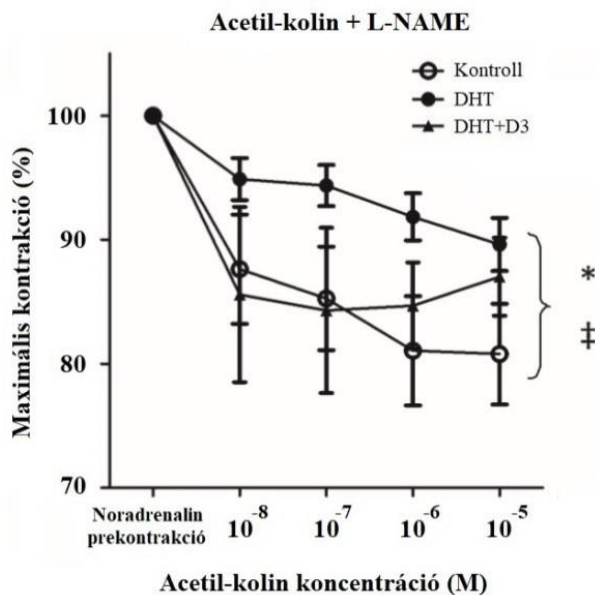
4.3.5.2. Vazorelaxáció acetilkolinra

10^{-6} M NA-prekontrakciót követően az acetyl-kolin a teljes dózistartományban (10^{-8} - 10^{-5} M) szignifikánsan nagyobb relaxációt váltott ki a kontroll csoportban a DHT és a DHT+D₃-kezelt csoportokhoz képest ($p < 0,05$ mindkét összehasonlítás esetében). Nagyobb ACh dózisoknál (10^{-6} - 10^{-5} M) a DHT+D₃-csoport relaxációja szignifikánsan nagyobb volt, mint a DHT csoporté (33. ábra, *, ‡, † $p < 0,05$).



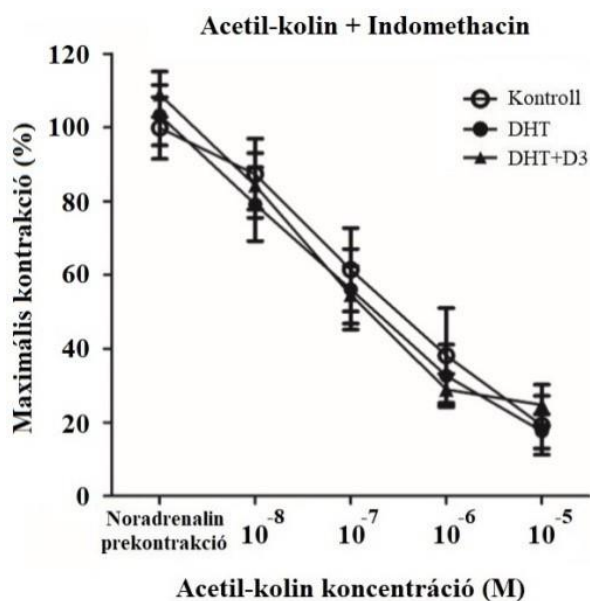
33. ábra: 10^{-6} M NA-előkezelést követő Acetil-kolin indukálta relaxáció csoportonként (* $p < 0,05$ kontroll vs. DHT; † $p < 0,05$ kontroll vs. DHT+D₃; DHT+D₃ vs. DHT ‡ $p < 0,05$)

L-NAME inkubációt követően szignifikáns különbséget találtunk az ACh-relaxációban a teljes méréstartományban a DHT-csoport és a másik két csoport (kontroll és DHT+D₃-kezelt) értékei között (34. ábra, *, ‡ $p < 0,05$).



34. ábra: L-NAME előkezelést követő Acetil-kolin indukálta relaxáció csoportonként (kontroll vs. DHT *: $p < 0,05$; DHT vs. DHT+D₃ ‡: $p < 0,05$)

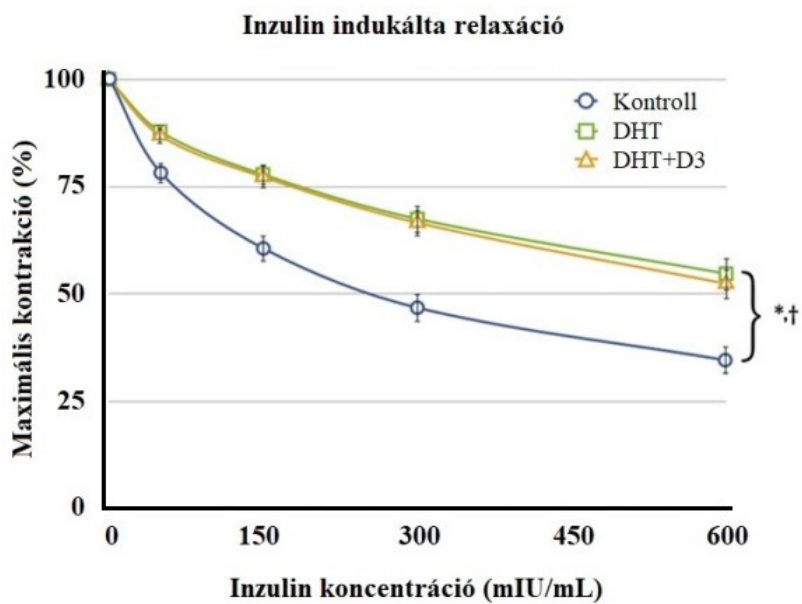
Indometacin inkubációt követően az ACh-indukált relaxáció a három csoportban a teljes dózistartományban gyakorlatilag azonos volt (35. ábra, n.s.).



35. ábra: Indometacin előkezelést követő Acetil-kolin indukálta relaxáció csoportonként. Nincs szignifikáns különbség.

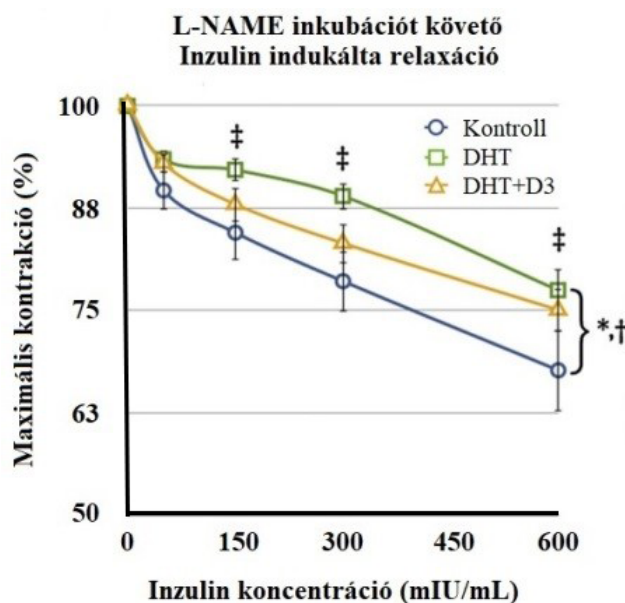
4.3.5.3. Aorta gyűrűk inzulin-indukált vazorelaxációja

Az inzulin-indukált relaxáció szignifikánsan kisebb volt a DHT-kezelt csoportokban, mint a kontroll csoportban. (36. ábra, *, † $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT, kontroll vs DHT+D₃). A D₃-vitamin kezelés nem volt szignifikáns hatással az inzulin-indukálta relaxációra aortán.



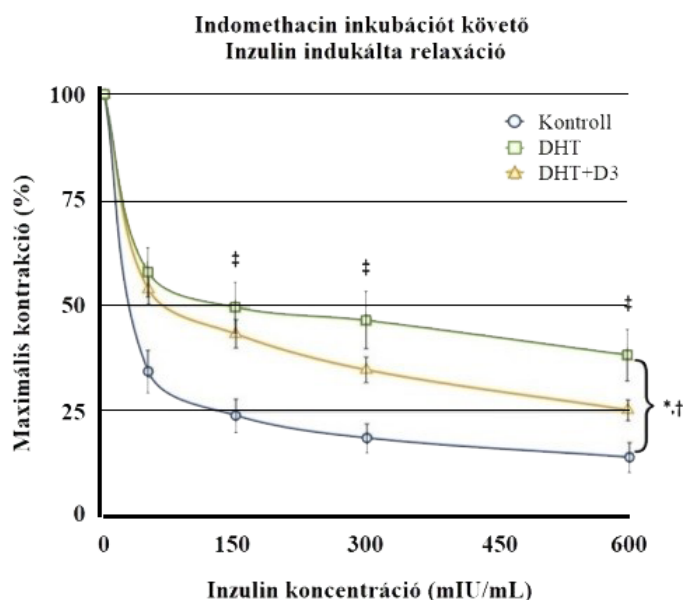
36. ábra: Inzulin-indukálta relaxáció aortán (átlag $\pm$ SEM, $p < 0,05$ *: Kontroll vs. DHT, †:Kontroll vs. DHT+D₃)

Az L-NAME inkubáció szignifikánsan csökkentette az inzulin-indukálta relaxációt a kontroll-állatokban. A teljes dózistartományban az L-NAME inkubációt követő inzulin-indukálta relaxáció szintén szignifikánsan csökkent a DHT-kezelt állatokban a kontroll csoporthoz viszonyítva (37. ábra, * $p < 0,01$ Kontroll vs DHT, † $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT+D₃). A D-vitamin-kezelés összességében javított az L-NAME inkubációt követő inzulin-indukált relaxáción (‡: $p < 0,05$ DHT vs. DHT+D₃).



37. ábra: Inzulin-indukált relaxáció L-NAME előkezelést követően aortán (*: $p < 0,01$ Kontroll vs. DHT; †: $P < 0,05$ Kontroll vs. DHT+D₃; ‡: $P < 0,05$ DHT vs. DHT+D₃)

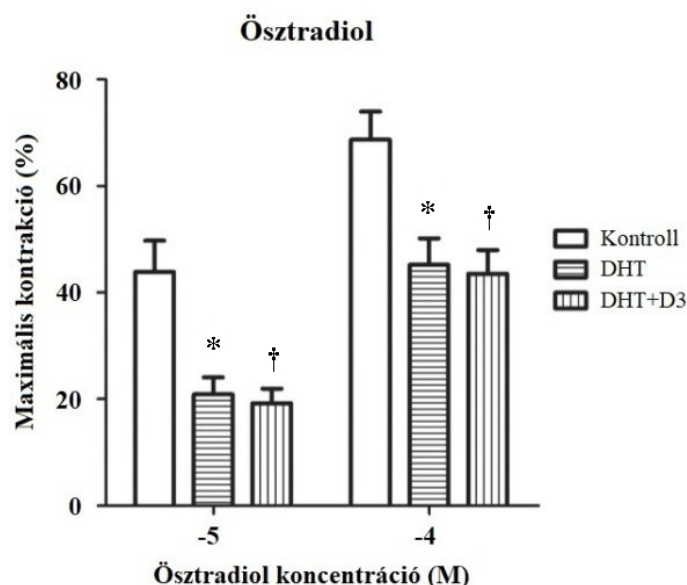
Az inzulin-indukálta relaxáció szintén csökkent indometacin hatására. Indometacin inkubációt követően, az inzulin-indukálta relaxációs görbék csökkentek a DHT-kezelt csoportokban (38. ábra, *, †, ‡ $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT, Kontroll vs. DHT+D₃ és DHT vs. DHT+D₃). A D-vitamin kezelés szignifikánsan növelte az inzulin-indukálta vazorelaxációt a DHT-kezelt csoporthoz képest a 150-600 mIU/ML dózistartományban.



38. ábra: Inzulin-indukálta relaxáció indometacin előkezelést követően aortán a kezelt és kontroll csoportokban. (*: Kontroll vs. DHT, $p < 0,05$; †: Kontroll vs. DHT+D₃, $p < 0,05$; ‡: DHT vs. DHT+D₃, $p < 0,05$)

4.3.5.4. Akut ösztrogén-vazorelaxáció csökken hiperandrogén állatokban

Ex vivo az ösztradiol (E_2) vazorelaxációt indukált a prekontrahált aortákon. Ez a hatás szignifikánsan gyengébb volt a DHT-kezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A D-vitamin nem állította helyre az ösztradiolra adott vaszkuláris válaszkészséget, azaz E_2 ugyanolyan relaxációt indukált a DHT+D₃-csoportban, mint a DHT-kezelt csoportban (39. ábra, Kontroll vs. DHT, Kontroll vs. a DHT+D₃ *, † $p < 0,01$; DHT vs. DHT+D₃ n.s.).



39. ábra: Ösztradiol-függő vazorelaxáció gyengébb kísérletes PCOS-modellben

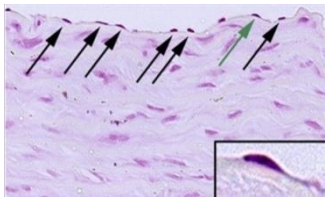
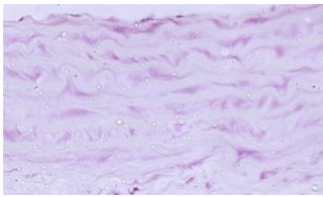
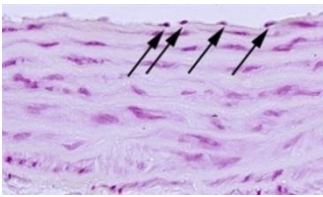
(*: $p < 0,01$ Kontroll vs. DHT, †: $p < 0,01$ Kontroll vs. DHT+D₃)

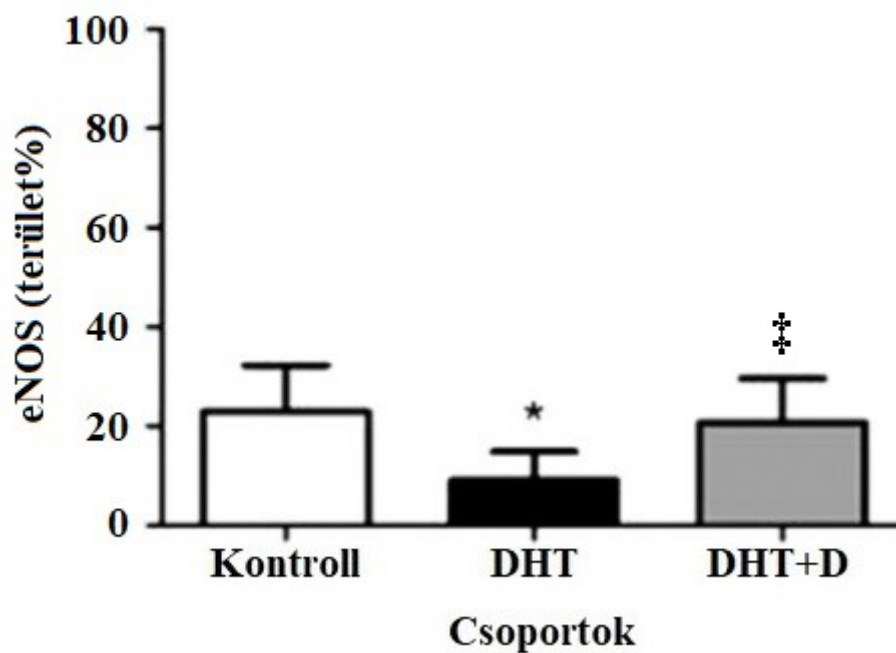
Tehát a DHT-kezelt csoport aortáiban az ösztradiol-függő vazorelaxáció szignifikánsan csökkent ($p < 0,01$) a kontroll csoporthoz viszonyítva, és D₃-vitamin-kezelés sem javított ezen.

4.3.6. Érfali eNOS és COX₂ expresszió változások aortában (szövetten)

A DHT-kezelt csoportokban az endotheliális NO-szintáz expresszió aortában szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, és - valószínűleg a kompenzatorikus mechanizmusként – a ciklooxygenáz-2 festődés intenzitás ellentétes tendenciát mutatott (5. és 6. táblázat, 40. és 41. ábra).

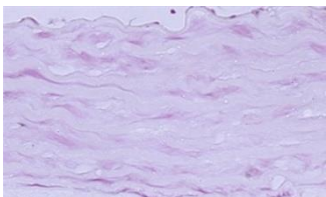
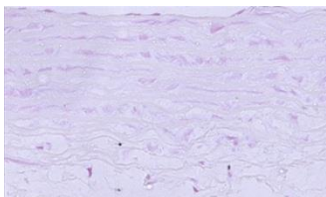
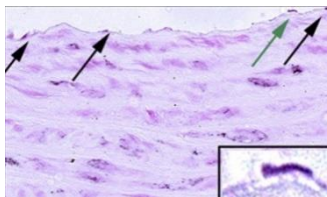
5. táblázat: Reprezentatív aorta anti-eNOS IHC festett metszetek csoportonként.

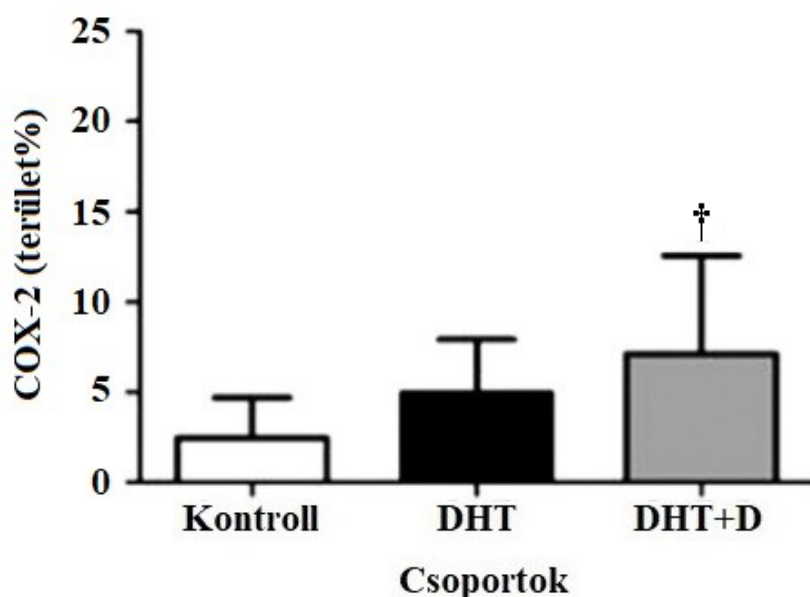
Anti-eNOS			
	Kontroll	DHT	DHT+D



40. ábra: Aorták falának endotheliális NO-szintáz-festődése; átlag $\pm$ SEM, *: $p \leq 0,05$ DHT vs. Kontroll, ‡: $p \leq 0,05$ DHT + D₃ vs DHT.

6. táblázat: Reprezentatív aorta anti-COX₂ IHC festett metszetek csoportonként.

Anti-COX ₂			
	Kontroll	DHT	DHT+D



41. ábra: Aorták falának endotheliális COX₂ -festődése, átlag±SEM, †: $p \leq 0,05$ DHT+D₃ vs. Kontroll

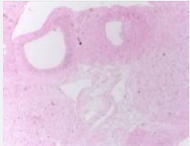
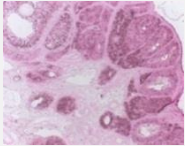
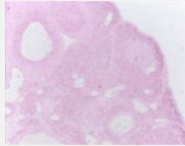
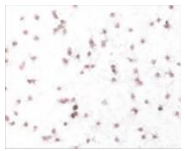
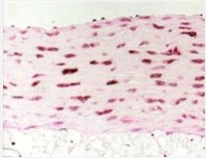
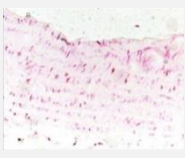
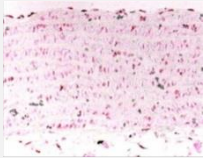
Egyidejű D-vitamin kezelést követően az eNOS-expresszió mértéke visszatért a kontroll szintjére (5. táblázat, 40. ábra). Ugyanakkor a COX₂-expresszió szignifikánsan emelkedett a kontroll-csoportéhoz képest (6. táblázat, 41. ábra).

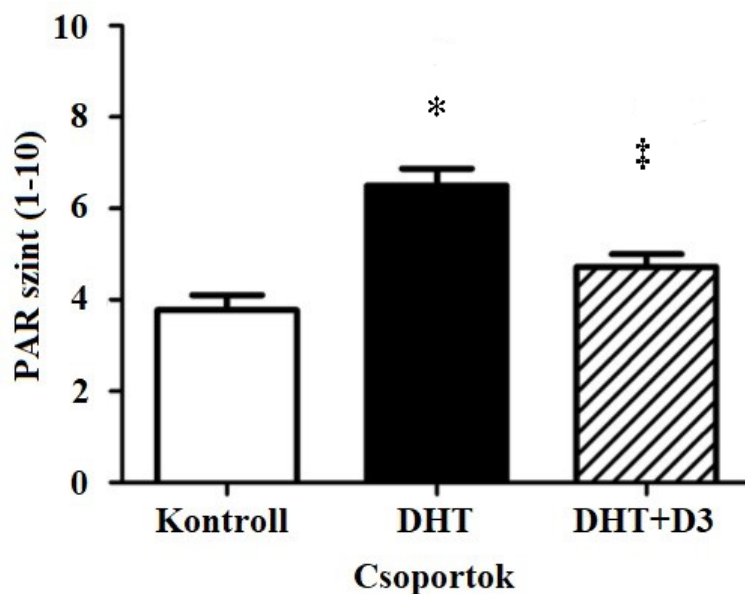
4.3.7. Oxidatív-nitratív stressz változásai különböző szövetekben hiperandrogén állapotban és D-vitamin kezelés hatására

4.3.7.1. A PARP-aktivitás szelektíven szabályozott különböző szövetekben hiperandrogén állapotban

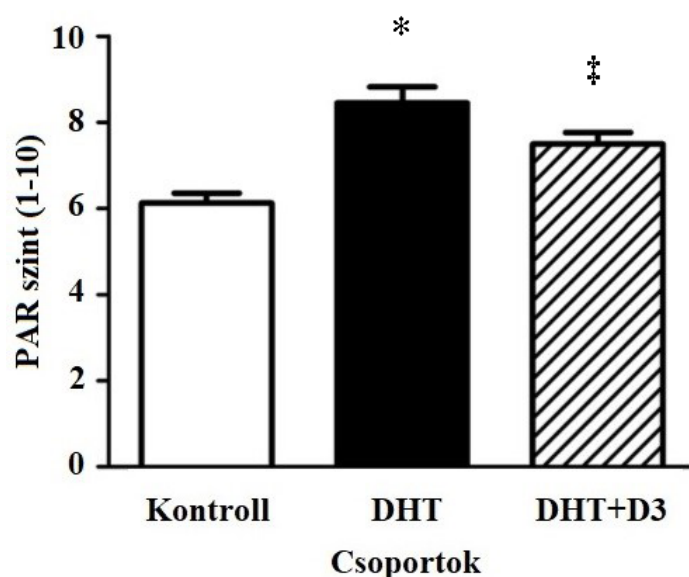
A PARP aktivitás a sejtszintű DNS-károsodás markere, és úgy tűnik, hogy ösztrogén hatás befolyásolja [72]. A PAR-antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a kontroll állatok különböző szöveiben – keringő leukociták, ovariumok, endothel, vaszkuláris simaizom sejtek ugyanolyan PAR-festődést találtunk. A különböző kezelésben részesült csoportok összehasonlítása során azonban két határozott mintázat látszódott: a DHT-kezelés fokozta a PARP-aktivitást az ovariumokban és a keringő leukocitákban, amelyet a D₃-vitamin gátolt (7. táblázat, 42., 43. ábra, Kontroll vs. DHT * $p < 0,05$, DHT vs. DHT+D₃ ‡ $p < 0,05$).

7. táblázat: PAR-festődés különböző szervekből származó szövetmintákon, reprezentatív képek

Csoportok/Vizsgált szövetminták	Kontroll	DHT	DHT+D3
Ovariumok			
Keringő leukociták			
Aorták			

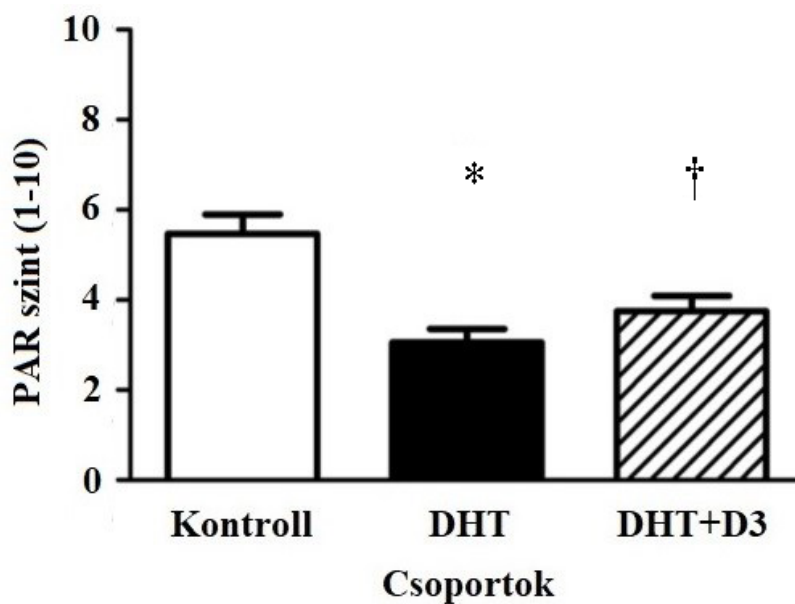


42. ábra: Ovariumok PAR-értéke (*: $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT, ‡: $p < 0,05$ DHT vs. DHT+D₃)

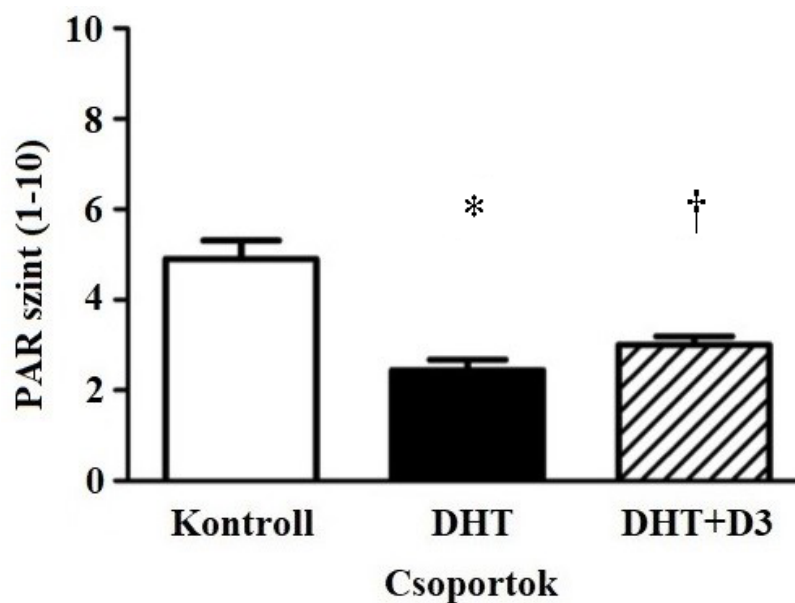


43. ábra Keringő leukociták PAR-értéke (*: $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT, ‡: $p < 0,05$ DHT vs. DHT+D₃)

Ezzel ellentétben az vaszkuláris endothelben és a simaizom sejtekben a PAR-festődés mindkét DHT-csoportban szignifikánsan gyengébb volt (44., 45. ábra, Kontroll vs. DHT és Kontroll vs. DHT+D₃; *, † $p < 0,05$), tehát ezt a hatást a D-vitamin kezelés nem befolyásolta.



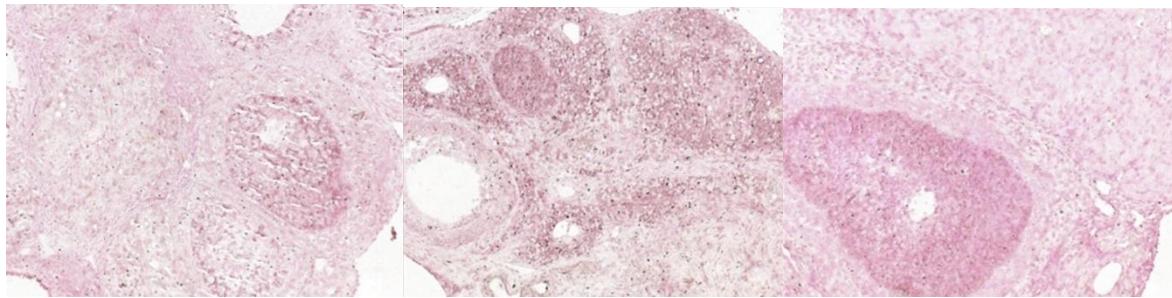
44. ábra: Ér endothel PAR-értéke. (*, †: $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT és Kontroll vs. DHT+D₃)



45. ábra: Ér simaizomsejtek PAR-értéke. (*, †: $p < 0,05$ Kontroll vs. DHT és Kontroll vs. DHT+D₃)

4.3.7.1. A nitratív stressz változásai különböző szövetekben hiperandrogén állapotban és D-vitamin kezelés hatására

A DHT-csoportban a nitratív stressz jellemzésére használt nitrotirozin festődés szignifikánsan nőtt ovariumban (46., 47. ábra, * $p \leq 0,001$, ‡ $p \leq 0,05$) (K: $4,42 \pm 0,6$; DHT: $21,47 \pm 3,4$ terület%), aorta szövetben (8. táblázat, 48. ábra, * $p \leq 0,001$, ‡ $p \leq 0,05$) (K: $0,39 \pm 0,06$; DHT: $1,41 \pm 0,23$ terület%) valamint keringő leukocitákban is (49. ábra, * $p \leq 0,05$).

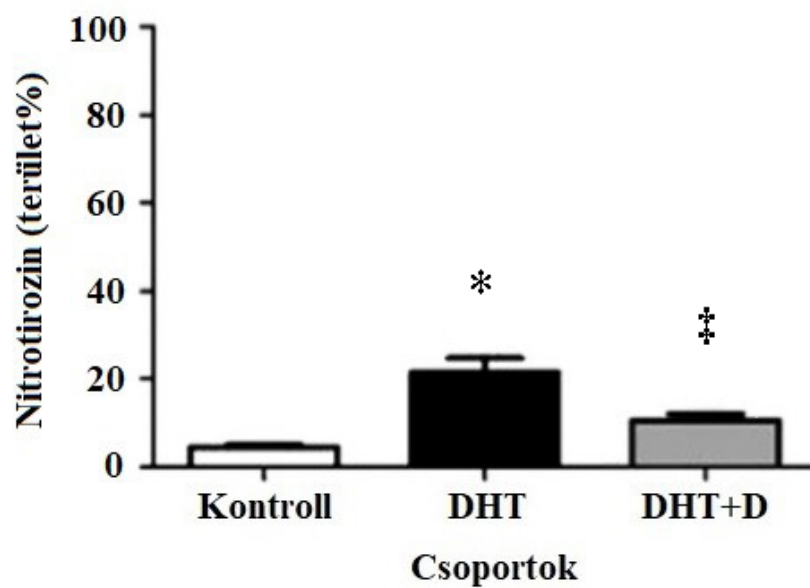


Kontroll

DHT

DHT+D

46. ábra: Reprezentatív Nitrotirozin-festett ovarium IHC-metszetek (20x)

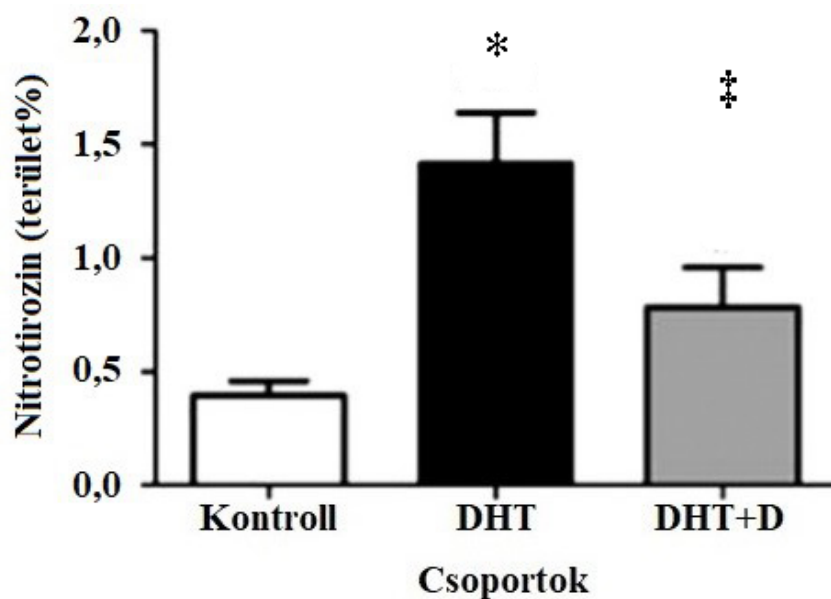


47. ábra: Nitratív stressz az ovariumban csoportonként, átlag $\pm$ SEM, *: $p \leq 0,001$ DHT vs. Kontroll, ‡: $p \leq 0,05$ DHT vs. DHT+D

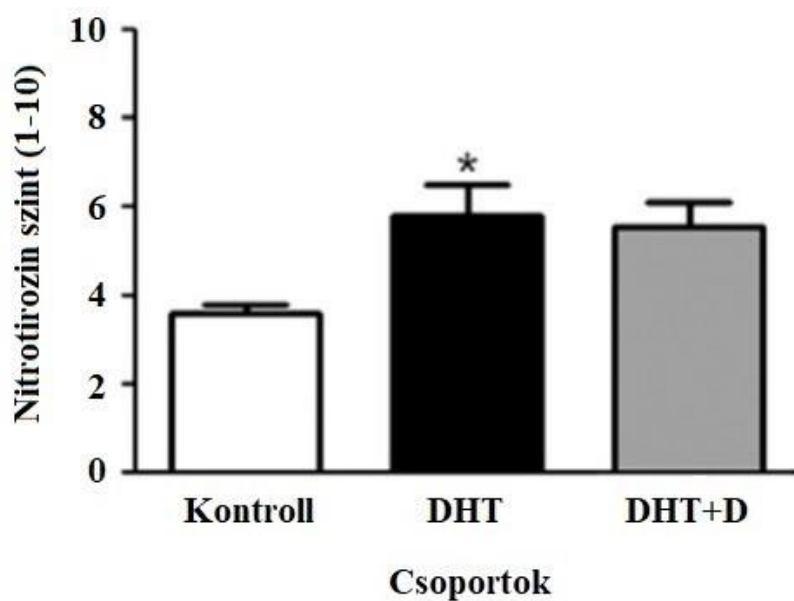
8. táblázat Reprezentatív aorta anti-NT IHC festett metszetek csoportonként.

(Skála: 50 μ m)

Anti-Nitrotirozin			
	Kontroll	DHT	DHT+D



48. ábra: Aorták falának nitrotyrosin-festődése, átlag $\pm$ SEM, *: $p \leq 0,001$ DHT vs. Kontroll, ‡: $p \leq 0,05$ DHT vs DHT+D



49. ábra: Nitratív stressz a keringő leukocitákban. Keringő leukociták nitrotyrosin-festődése, átlag $\pm$ SEM, *: $p \leq 0,05$ DHT vs. Kontroll.

A D3-vitamin kezelésnek összetett hatásai mutatkoztak: az ovariumokban a nitrotyrosin képződés csökkent (DHT+D: $10,45 \pm 1,5$ terület%) párhuzamosan a morfológiai védelemmel (46., 47. ábra).

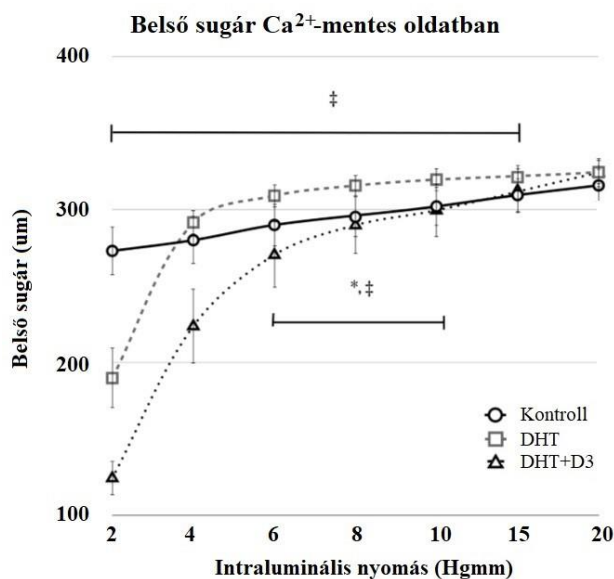
Bár a glükóz metabolizmus a kontroll-csoport szintjére tért vissza, az általános nitratív stressz (amelyet a keringő leukociták nitrotyrosin-szintjével vizsgáltunk) nem változott D₃-vitamin-kezelés hatására (8. táblázat, 48. ábra).

Az aorta esetében a nitrotirozin szint szintén csökkent (49. ábra).

4.3.8. Vénás változások korai PCOS modellünkben (2A modell)

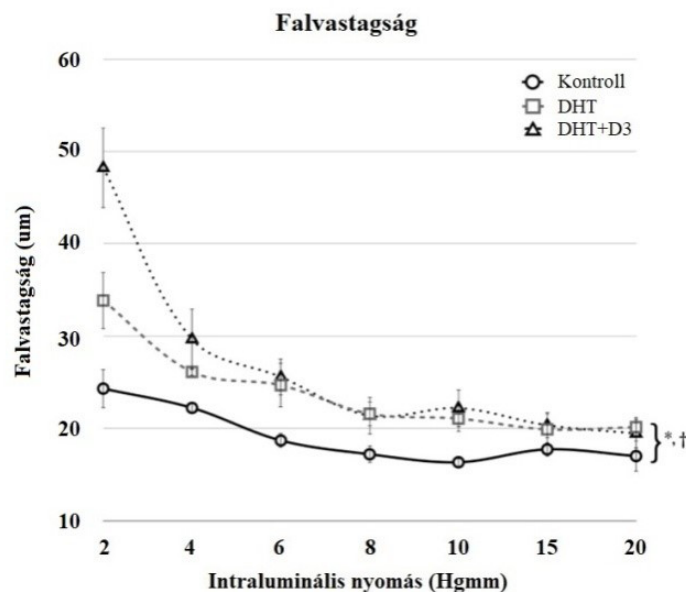
4.3.8.1. Vena saphena geometria

A DHT-kezelés növelte a Ca^{2+} -mentes oldatban mért, relaxált külső és belső sugarat, ezt a választ az egyidejű D-vitamin-kezelés megelőzte (50. ábra, *, ‡ $p < 0,05$). A DHT és DHT+D₃-csoportok közti különbség magasabb nyomásokon szinte eltűnt.



50. ábra: Ca^{2+} -mentes oldatban mért belső sugár (μm). 5 Hgmm-es nyomáson Ca^{2+} -mentes oldatban létrejövő relaxáció hasonló volt a kontroll és a DHT+D₃ csoportokban. Mindkét csoportban szignifikánsan kisebb ($p < 0,05$) sugarakat mértünk, mint a DHT-csoportból izolált erekben. Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

A DHT-kezelés növelte a vénás falvastagságot, amely a kontroll csoportban szignifikánsan kisebb volt, mint – a D-vitamin kezeléstől függetlenül – a DHT-kezelt csoportokban (51. ábra, *, † $p < 0,05$).



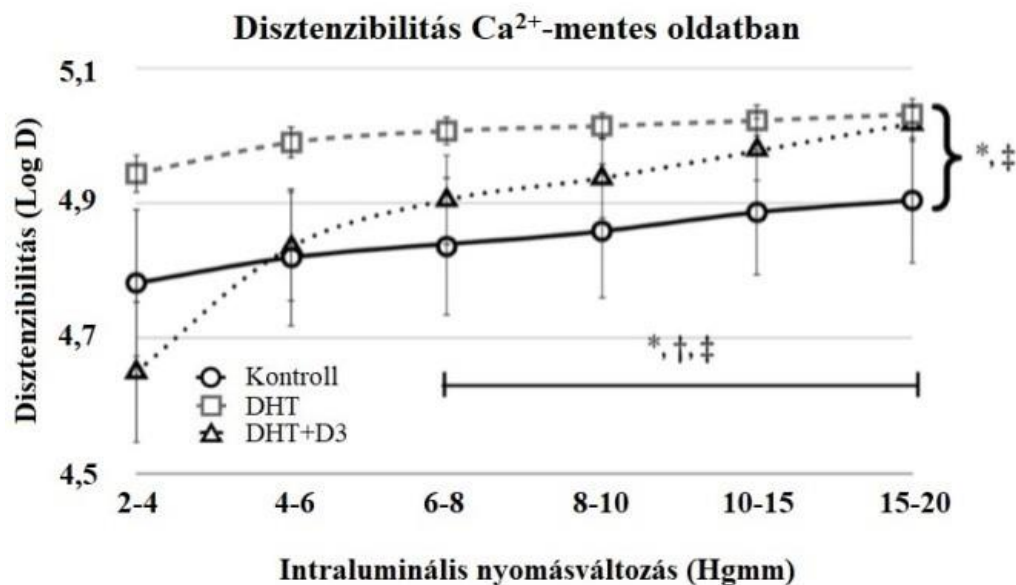
51. ábra: Ca^{2+} -mentes oldatban mért falvastagság (μm). A falvastagság szignifikánsan nagyobb volt a DHT-kezelt erekben a kontrollokhoz viszonyítva ($p < 0,05$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll

Hasonlóan a falvastagsághoz, a falkeresztmetszeti terület szignifikánsan különbözött a teljes nyomástartományban ($p < 0,001$).

4.3.8.2. Vena saphena érbiomechanika

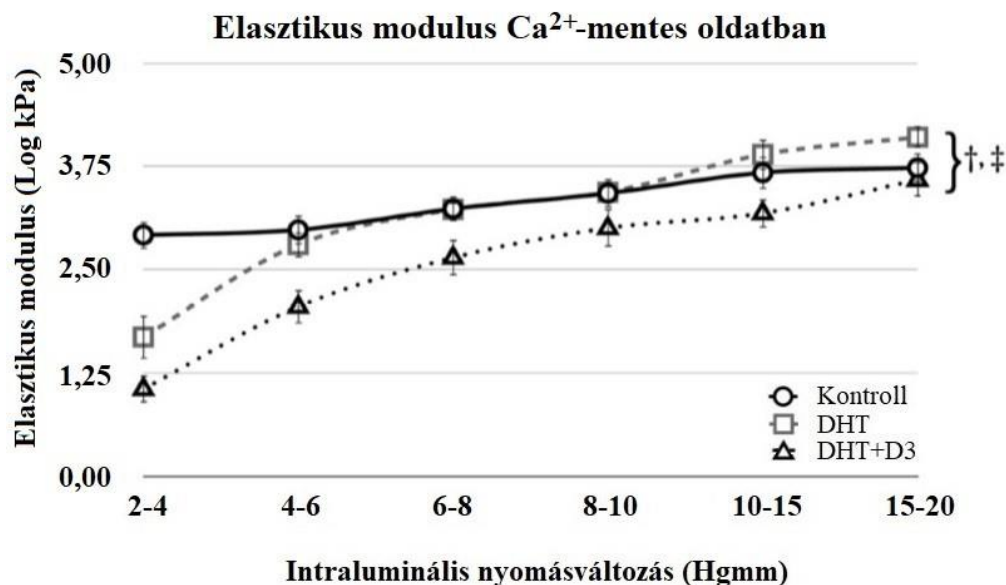
Az érfalak mechanikai terhelését jellemző tangenciális falfeszülést nem érintette sem a DHT, sem a D-vitamin-kezelés, illetve ennek alapján az adaptációs változások egyik motorja a falfeszülés stabilizálása lehet.

Az izobárikus disztenzibilitás a DHT-kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a teljes nyomástartományban a két másik csoporthoz képest Ca^{2+} -mentes oldatban (52. ábra, *, †, $p < 0,005$). A párhuzamos D-vitamin-kezelés részlegesen kompenzálta ezt a változást (52. ábra, †, $p < 0,05$).



52. ábra: A disztenzibilitás Ca^{2+} -mentes oldatban szignifikánsan nagyobb volt a DHT-csoportban a másik két csoporthoz képest a teljes nyomástartományban ($p < 0,005$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

A DHT-kezelés önmagában nem befolyásolta az erek izobárikus elasztikus modulusát. Ca^{2+} -mentes oldatban a DHT+D₃-kezelt erek elasztikus modulusa szignifikánsan kisebb volt a teljes nyomástartományban, mint a csak DHT-kezeltnek és a kontrolloknak (53. ábra, †, ‡ $p < 0,001$).

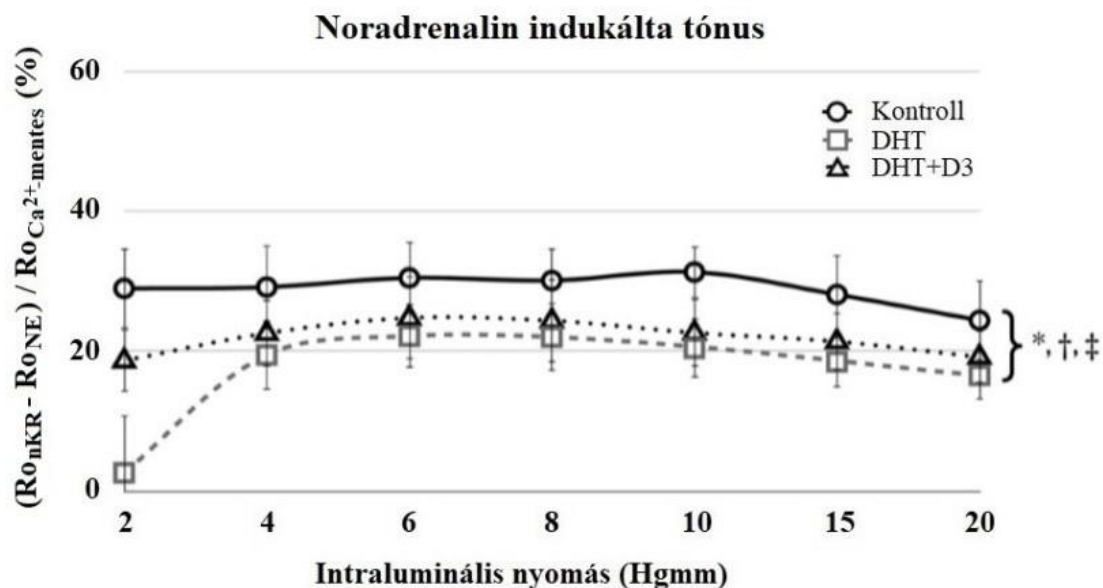


53. ábra: Elasztikus modulus Ca^{2+} -mentes oldatban. Az elasztikus modulusban a DHT-csoport nem különbözött a kontrolltól, ugyanakkor a DHT+D₃ szignifikánsan kisebb volt a másik két csoporthoz képest ($p < 0,001$). Átlag $\pm$ SEM, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

Az ér elaszticitás hasonló változását eredményezte a D-vitamin-kezelés, amennyiben az elasztikus modulus a tangenciális falfeszülés függvényében ábrázoltuk. Az elasztikus modulus a DHT+D₃ csoportban volt a legkisebb a teljes nyomástartományban Ca^{2+} -mentes oldatban ($p < 0,05$ Kontroll vs. DHT+D₃ és DHT vs. DHT+D₃; DHT vs. Kontroll: nem szignifikáns).

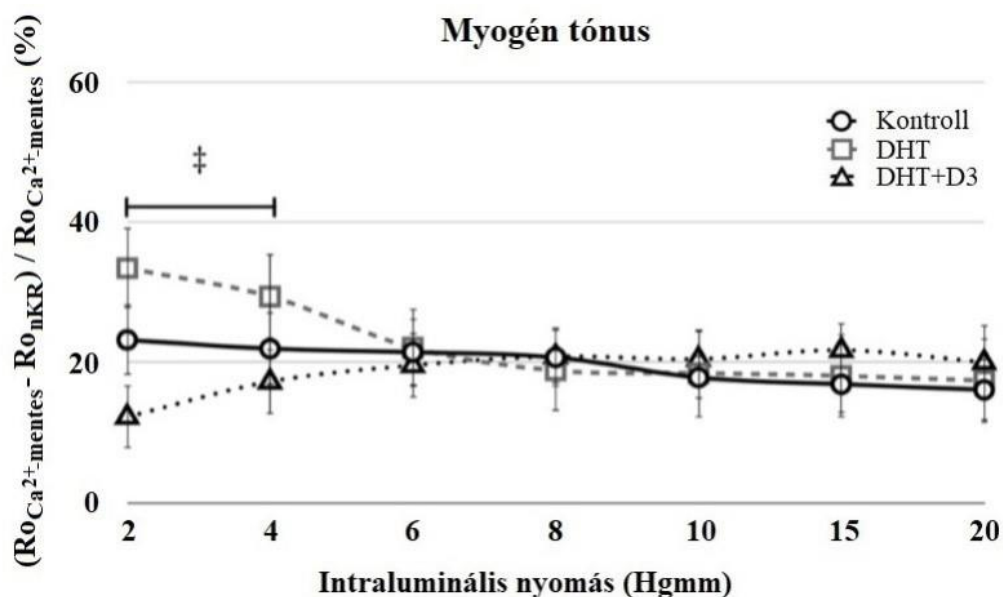
4.3.8.3. Vena sahena kontraktilitás és relaxáció

A NA kontrakció mértékében mindegyik csoport szignifikánsan különbözött a teljes nyomástartományban. A DHT-kezelés szignifikánsan csökkentette a NA-tónust, melyet a D-vitamin-kezelés részben ellensúlyozott (54. ábra, *, †, ‡ $p < 0,001$).



54. ábra: NA-indukált tónus a nKR-oldatban mért spontán tónushoz viszonyítva. A NA kontrakció jelentősen csökkent a DHT-csoportban, a másik két csoporthoz viszonyítva ($p < 0,001$). Mindegyik csoport szignifikánsan különbözött a többitől a teljes nyomástartományban. Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

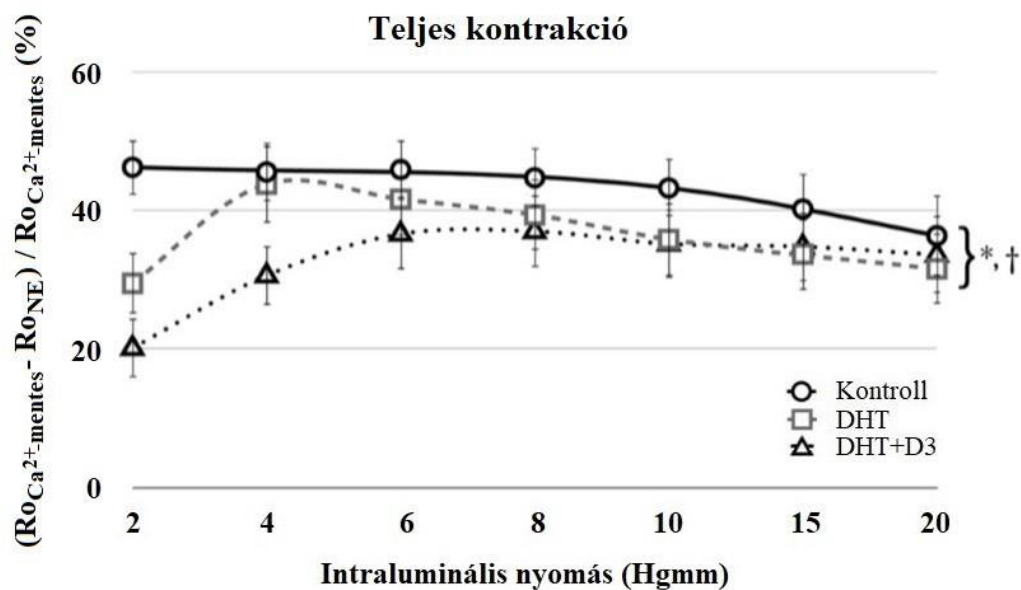
Ezen szegmensek kifejezett myogén (spontán) tónussal rendelkeznek. Csak DHT-kezelést követően e tónus magasabb volt a DHT + D₃ csoporthoz képest alacsonyabb, fiziológiás nyomásokon (55. ábra, ‡ $p < 0,05$, 2-4 Hgmm között). A kontroll csoport nem különbözött a két másik csoporttól. Ez a különbség magasabb nyomásokon eltűnt.



55. ábra: A vénák myogén tónusa A DHT+D₃ csoport szignifikánsan különbözött a DHT-csoporttól az alacsonyabb nyomástartományban (2-4 Hgmm között, $p < 0,05$). A myogén tónus a legnagyobb a DHT-, a legkisebb a DHT+D₃ csoportban volt. A kontroll csoport nem különbözött a másik két csoporttól. Magasabb nyomásokon (6-20 Hgmm között) nem volt szignifikáns különbség a 3 csoport között.

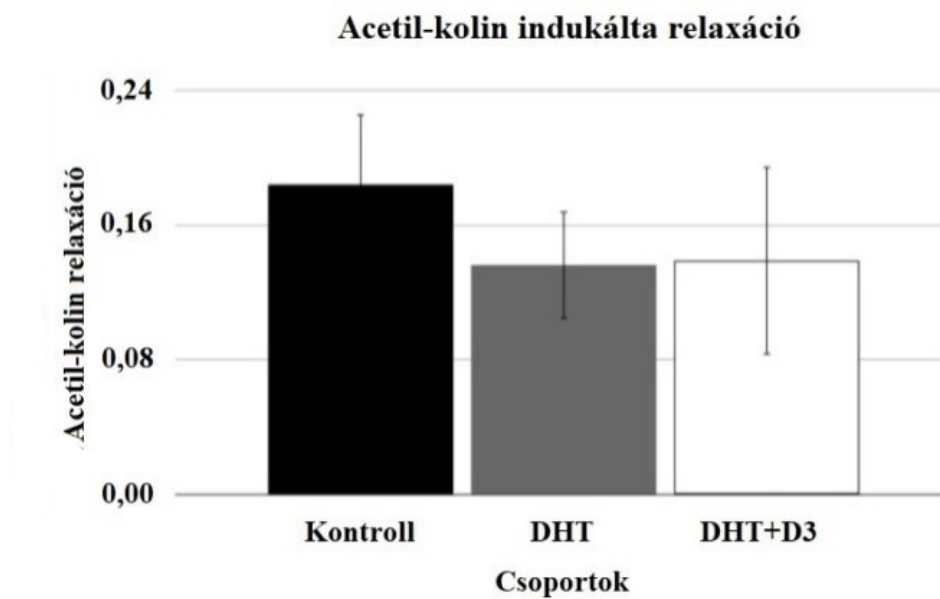
Átlag $\pm$ SEM, †: DHT+D₃ vs. DHT

A kontrakciót és a relaxációt összegezve kapjuk meg az erek teljes farmakológiai adaptációs tartományát, mely szignifikánsan csökkent DHT-kezelést követően. Erre a változásra a D-vitamin-kezelés nem volt hatással, de a DHT+D₃-csoport erei relaxáltabb állapotban voltak a sima DHT kezeltékhez képest (56. ábra, *, † $p < 0,005$).



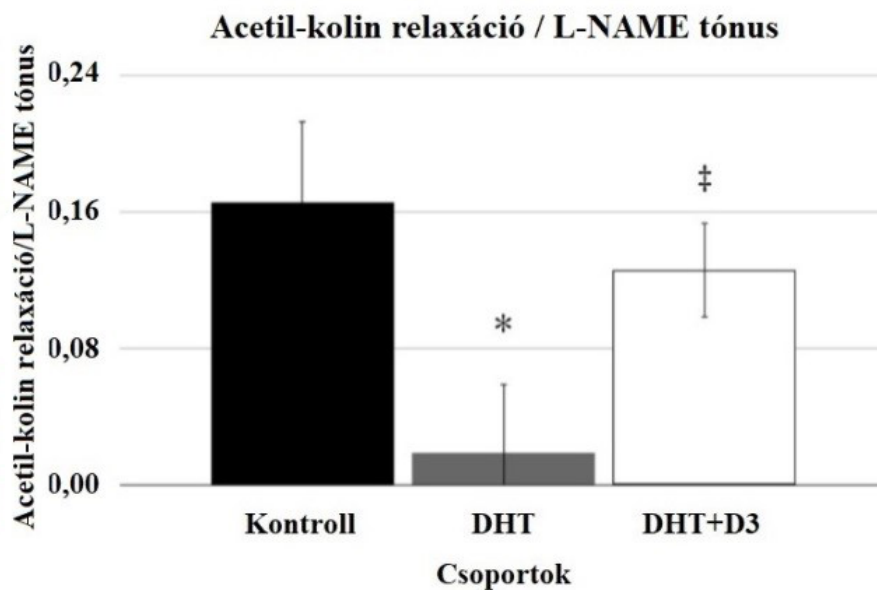
56. ábra: A vénák teljes farmakológiai adaptációs tartománya. A DHT-kezelt csoport szignifikánsan különbözött a kontroll csoporttól a teljes nyomástartományban ($p < 0,005$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

NA-prekontrakciót követően 1 μ M ACh adását követően az endotheliális relaxációban nem igazolódott szignifikáns különbség a csoportok közt (57. ábra, n.s.).



57. ábra: ACh-indukált relaxáció. Abszcissa: maximális relaxációhoz (Ca^{2+} -mentes oldat) viszonyított (10^{-6} M) ACh-indukált relaxáció. A három csoport között nem volt szignifikáns különbség az ACh-relaxációban.

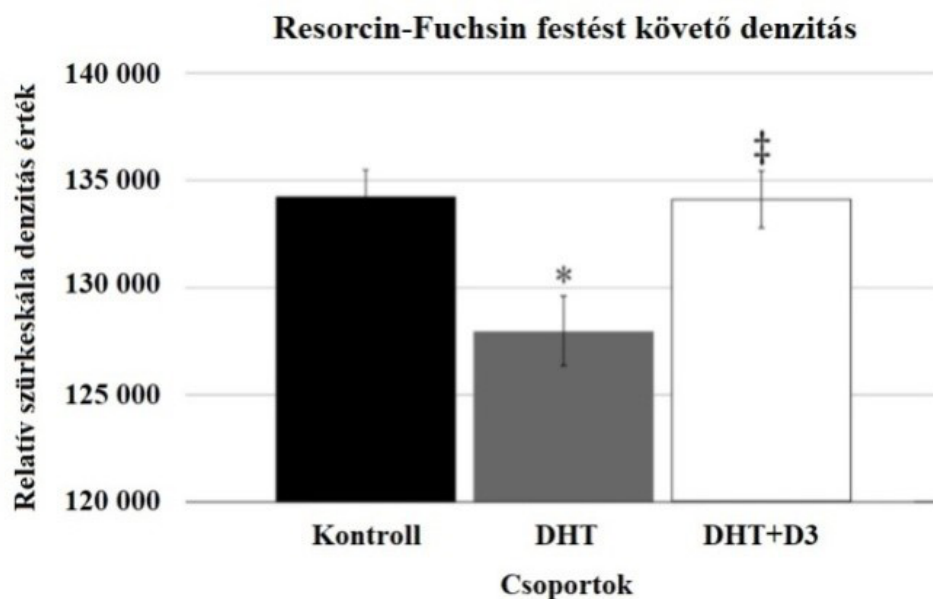
Ugyanakkor L-NAME hozzáadást követően kialakult kontrakció szignifikánsan csökkent a DHT-kezelt csoportban a két másik csoporthoz képest. Tehát a D-vitamin-kezelés visszafordította a DHT kezelés által indukált változást (58. ábra, *, ‡ $p < 0,05$).



58. ábra: (10^{-5} M) L-NAME-indukált tónus a (10^{-6} M) ACh-indukált relaxáció során mért sugarakhoz viszonyítva. Abszcissza: ACh-relaxáció során mért külső sugár és azt követő L-NAME-mel történő NO-blokkolás során mért külső sugár hányadosa. A hányados alacsonyabb volt a DHT-csoportban, mint a másik két csoportban. ($p < 0,05$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, †: DHT+D₃ vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

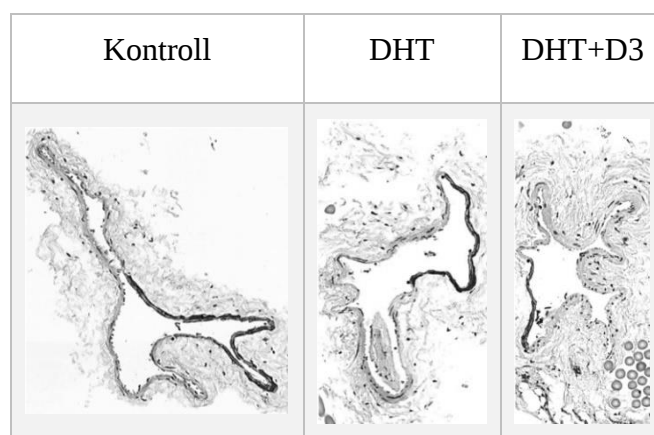
4.3.8.4. Vena saphena szövettani eredmények

Resorcin-fuchsin festést követően a vena saphena érfalban a DHT-csoportban szignifikánsan csökkent intenzitás, elasztikus rostdenzitás mérhető a másik két csoporthoz képest (59. ábra, 9. táblázat, *, ‡ $p < 0,005$).

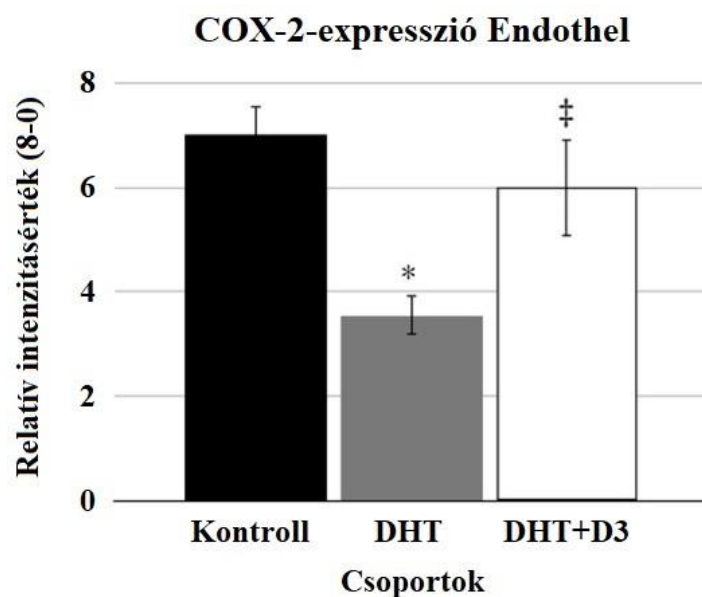


59. ábra: Resorcin-fuchsin (RF) festést követő denzitás. A 3 oszlop mutatja a relatív szürkeskála denzitást RF-festést követően. A denzitás az érfaelterület elasztin tartalmával korrelál. A denzitásban nem igazolódott különbség a kontroll és a DHT+D₃ csoportok között. A DHT-csoportban szignifikánsan kisebb denzitást találtunk ($p < 0,005$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

9. táblázat: Az alábbi képeken reprezentatív RF-festett erek láthatók

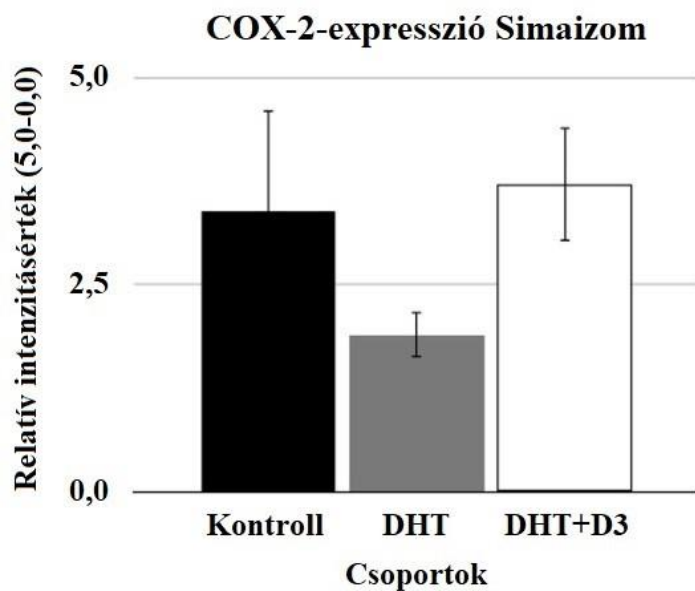


Immunhisztokémia. A DHT-kezelés szignifikánsan csökkentette az endothel COX₂ festődési intenzitását a kontrollhoz képest. A DHT-kezelés e hatását teljesen megelőzte a párhuzamos D-vitamin pótlás (60. ábra, 10. táblázat, *, ‡ $p < 0,05$).



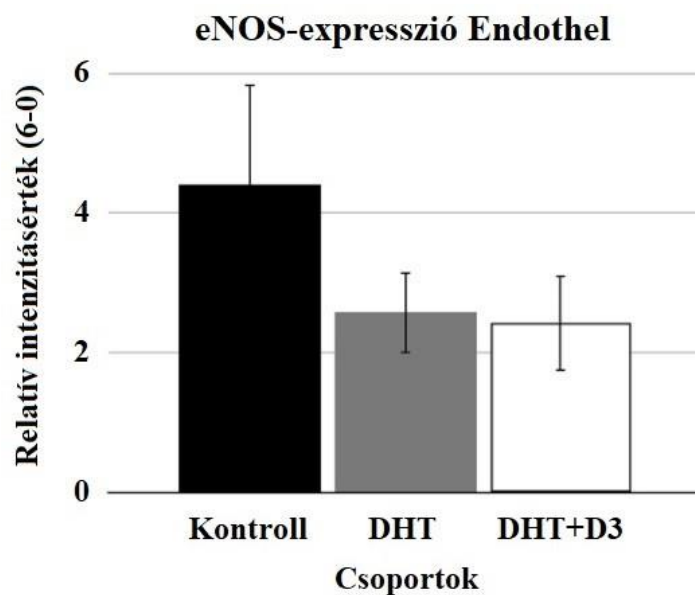
60. ábra: COX₂-expresszió vénás endothelben. Abszcissa: relatív COX₂-expresszió intenzitás kvantitatív IHC-val. A DHT-csoportban szignifikánsan alacsonyabb a COX₂-expresszió az endothelben a másik két csoporthoz képest ($p < 0,05$). Átlag $\pm$ SEM, *: DHT vs. Kontroll, ‡: DHT+D₃ vs. DHT

Hasonló tendencia a T. mediában is mutatkozott, azonban ez nem volt szignifikáns (61. ábra, 10. táblázat, n.s.).

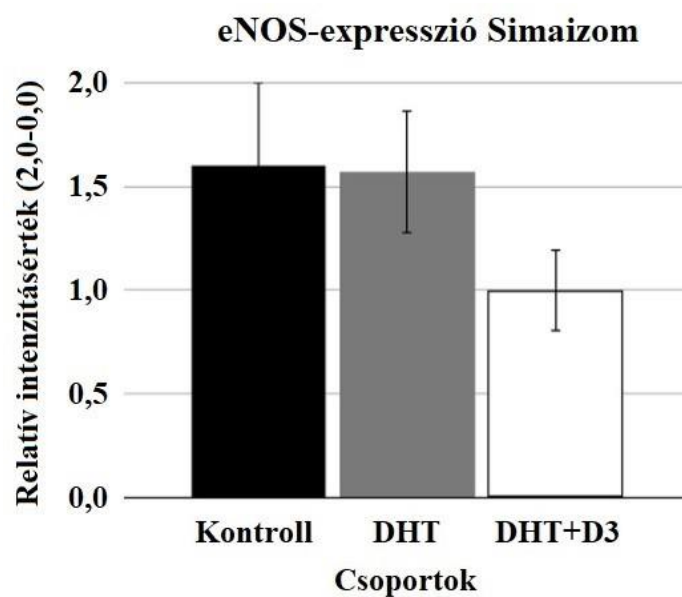


61. ábra: COX₂-expresszió simaizomban. A COX₂-expresszió az endothelhez hasonló tendenciát mutatott, de nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a csoportok között. Átlag $\pm$ SEM.

Az eNOS-expresszióban sem az endothelben (62. ábra, 10. táblázat), sem a simaizom (63. ábra, 10. táblázat) rétegben nem volt szignifikáns különbség a csoportok között.

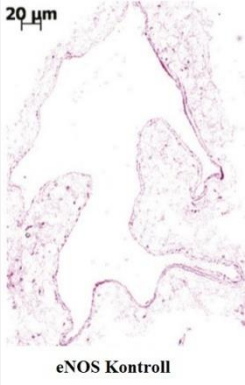
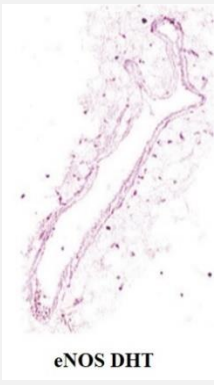
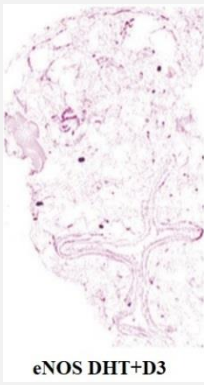
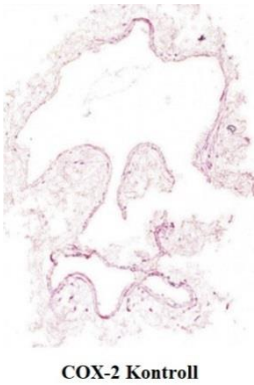
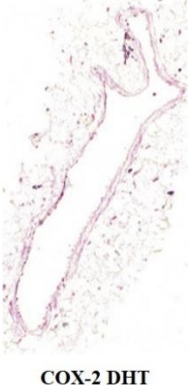
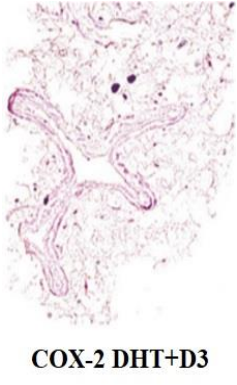


62. ábra: Az eNOS-expresszió az endothelben. Abszcissza: relatív eNOS-expresszió intenzitás. A három csoport között nem volt szignifikáns különbség. Átlag $\pm$ SEM.



63. ábra: Az eNOS-expresszió a simaizomban. Abszcissza: relatív eNOS-expresszió intenzitás. A három csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget. Átlag $\pm$ SEM.

10. táblázat: Az alábbi képeken demonstratív eNOS és COX₂ IHC-festett erek láthatóak csoportonként. Az eNOS enzimexpresszióban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között sem az endothelben sem a simaizomban. A DHT-kezelés csökkentette a COX₂-expressziót az endothelben a kontroll csoporthoz képest.

	Kontroll	DHT	DHT+D3
eNOS	 20 μm eNOS Kontroll	 eNOS DHT	 eNOS DHT+D3
COX-2	 COX-2 Kontroll	 COX-2 DHT	 COX-2 DHT+D3

4.4. Második PCOS modellünk első metabolikus és vaszkuláris eredményei (2B modell)

4.4.1. Alap élettani paraméterek és hormonszintek

11. Táblázat: Alap élettani paraméterek és hormonszintek †p<0,05 és ††p<0,01. *Szignifikánsan különbözik a D-vitamin pótolts, tesztoszteron-kezelés mentes csoporttól („dupla kontroll”), ‡ Szignifikánsan különbözik a D-vitaminhiányos állatoktól, p<0,01

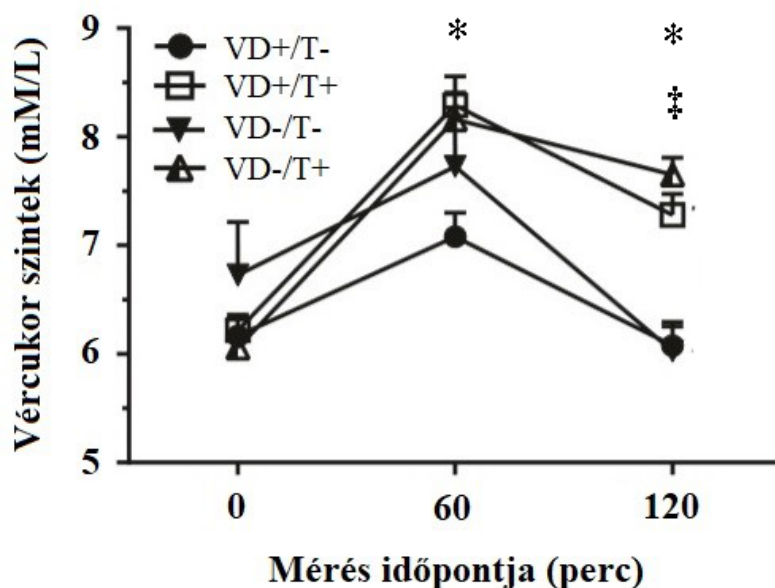
	VD+/T-, n=12	VD+/T+, n=12	VD-/T-, n=11	VD-/T+, n=11
Végső testsúly (g) ± SEM (8. hét)	282,5±6,2	327,8±8,3 ††	296,9±3,9	321,5±3,2††
Systolés vérnyomás (Hgmm) ± SEM (8. hét)	133,8±5,12	149,20±6,61	133,85±7,01	139,28±6,26
Tesztoszteron (ng/mL) ± SEM (8. hét)	0,311±0,16	4,292±0,56 ††	0,720±0,16	5,495±0,56††
5-dihidrotesztoszteron (ng/mL) ± SEM (8. hét)	0,098±0,01	0,623±0,14 †	0,117±0,018	0,601±0,16†
Progeszteron (ng/mL) ± SEM (8. hét)	19,201±2,42	11,641±1,47†	21,241±3,71	10,91±1,15††
25-hidroxikolekalciferol (ng/mL) ±SEM (8. hét)	32,328±4,49 ‡	33,106±4,46 ‡	6,044±0,63	6,006±0,68
Leptin (ng/mL) ± SEM (8. hét)	64,55±9,53	153,88±26,16†	118,97±16,23	113,85±28,47

A D-vitamin-pótolt állatok egyik fele transzdermális tesztoszteron-kezelést is kapott (VD+/T+-csoport, n=12), míg a másik 12 állat képezte a D-vitamin-pótolt, tesztoszteron-kezelésben nem részesült csoportot (VD+/T- -csoport, n= 12). Összesen 22 állat kapott D-vitamin-mentes diétát, amely markáns VDD-t alakított ki a kezelés során. Ezen állatok egyik fele tesztoszteron-mentes volt (VD-/T- -csoport, n=11), míg másik felük transzdermális tesztoszteron-kezelésben részesült (VD-/T+ -csoport, n=11).

A 8 héten át tartó rendszeres tesztoszteron-kezelés szignifikánsan nagyobb testsúlyokat eredményezett (11. táblázat, $p<0,01$). A D-vitamin is hatással volt a testsúlyra: a testtömeggyarapodás szignifikánsan több volt a D-vitaminhiányos csoportban (a tesztoszteron-mentes állatoknál (11. táblázat, $p<0,05$). A tesztoszteron (11. táblázat, $p<0,01$) és a dihidrotesztoszteron (11. táblázat, $p<0,05$) szint is szignifikánsan nagyobb volt a tesztoszteron-kezelésben részesült csoportokban a nem kezeltékhez képest.. Ezen adatok a transzdermális tesztoszteron-kezelés hatékonyságát mutatják. A szérumban a progeszteron szint csökkent, amely jellemző velejáróra a PCOS modellnek (hiányzó luteális fázis). Az ovariumban az átlagos folliculusszám szignifikánsan több volt, mint a kontroll csoportban, és jellemzően kisméretű, primordiális tüszők voltak láthatóak. A D-vitaminhiányos diéta alacsonyabb szérumban 25-hidroxikolekalciferol szintet eredményezett (egy ötöde), a D-vitamin pótolt csoportokhoz viszonyítva (11. táblázat, $p<0,01$), és az egyéb szexuálissteroid szintekben nem találtunk eltérést. Tesztoszteron-kezelés hatására a szérumban a leptin szint szignifikánsan nőtt (11. táblázat, $p<0,05$).

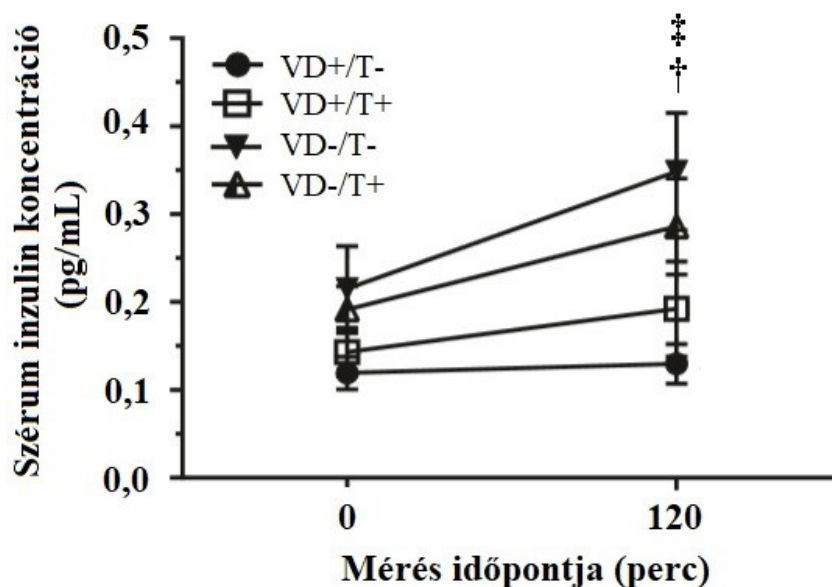
4.4.1.2. OGTT glükóz és inzulin szintek

Az éhomi vércukorszintekben nem volt szignifikáns különbség a négy csoport értékei között. A 60 perces vércukorszintek a VD+/T+-csoportban szignifikánsan magasabbak voltak a tesztoszteron-kezelésben nem részesült csoporthoz képest (64. ábra, *: VD+/T- vs VD+/T+, $p<0,05$). A tesztoszteron kezelés szignifikánsan magasabb 120 perces értékeket eredményezett függetlenül a D-vitamin státusztól (64. ábra, ‡: VD+/T- vs. VD-/T+ $p<0,05$ és * $p<0,01$).



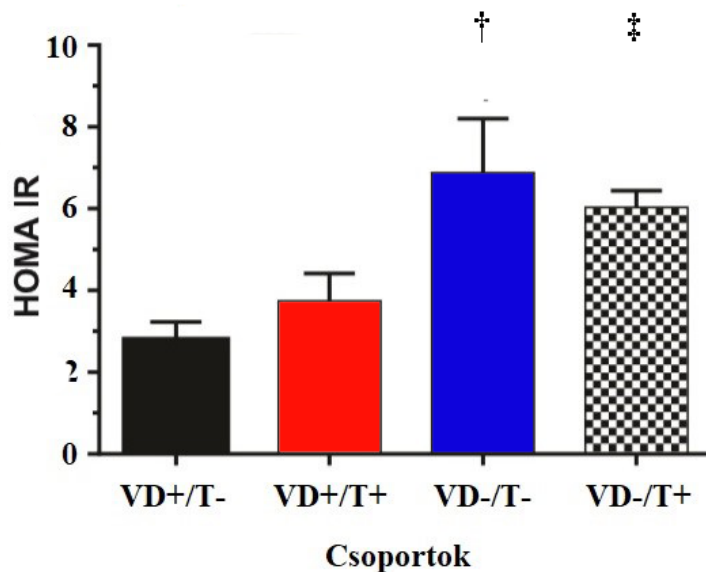
64. ábra: 6. heti OGTT-t követő szérumszén cukorszintek a 4 csoportban

A VDD emeli az OGTT 120 perces inzulin és HOMA-IR-t: Amíg az OGTT előtt mért plazma inzulin szintek közt nem volt különbség, addig a D-vitaminhiányos csoportok 120 perces értékei szignifikánsan magasabbak voltak a D-vitamin-pótolt kontroll csoport értékeihez képest (65. ábra, †: VD+/T- vs. VD-/T-, ‡ p<0,05).



65. ábra: OGTT-t követő plazma inzulin szintek

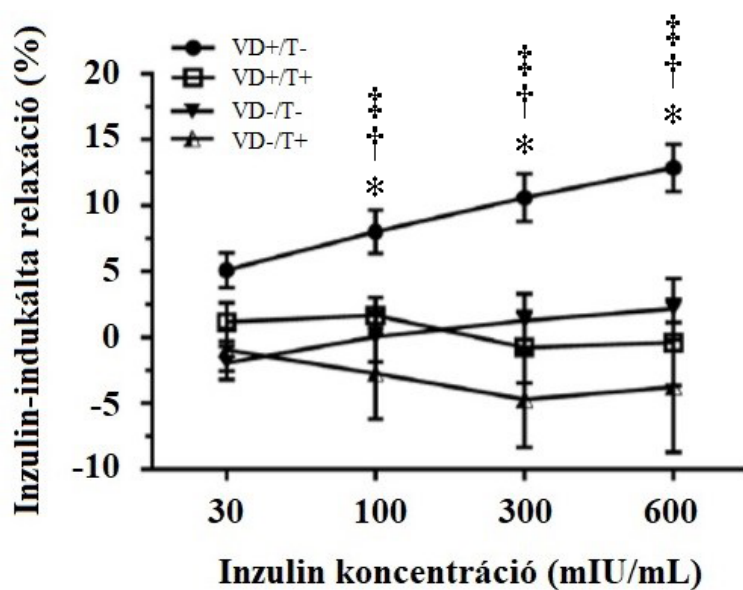
Továbbá a D-vitaminhiányos állatoknál szignifikánsan magasabb volt a számított HOMA-IR (66. ábra, †, ‡ p<0,05), a D-vitamin pótlathoz képest, függetlenül a tesztoszteron-kezelés meglététől vagy hiányától.



66. ábra: Számított HOMA-IR értékek

4.4.2. T-kezelés és VDD csökkenti a coronaria arteriolák inzulin-indukálta vazorelaxációját

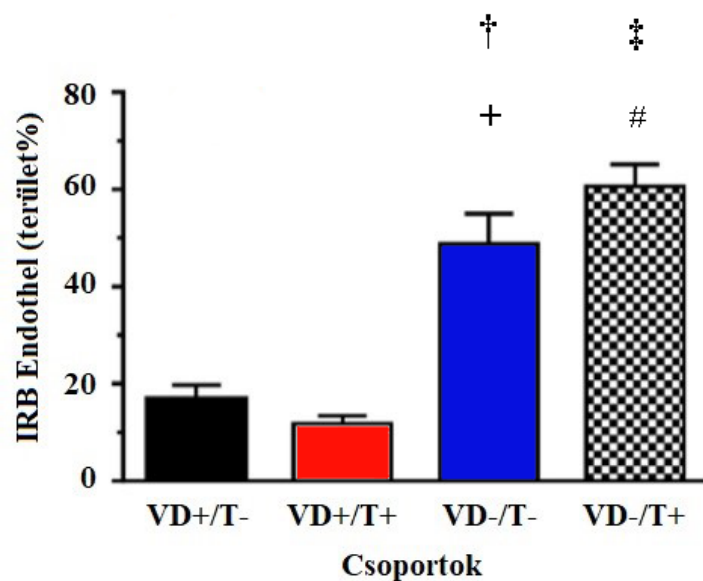
A coronaria arteriolák inzulinfüggő relaxációja a D-vitamin-pótolt, tesztoszteron-kezelés-mentes („dupla kontroll”) csoportban kimutatható, megtartott volt. Mindhárom másik csoportban szignifikánsan csökkent vagy elmaradt/ vagy kettős noxa esetén vazokonstrikcióba fordult (67. ábra, *, †, ‡ $p < 0,01$) a relaxáció.



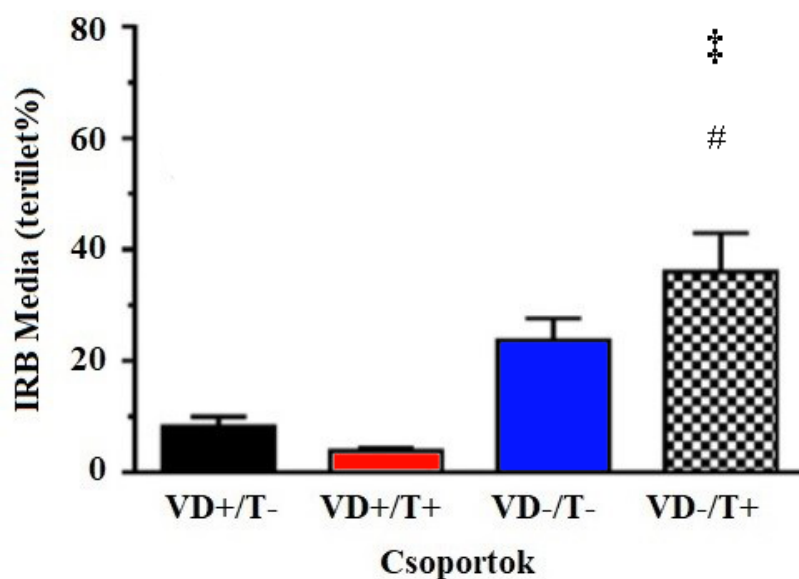
67. ábra: Intramuralis coronaria arteriolák In vitro relaxációja emelkedő inzulin-koncentráció hatására

4.4.3. A D-vitamin szabályozza az INZ-R és VDR-expressziót coronaria arteriola szövetben

A coronaria arteriolák inzulin-receptor denzitását immunhisztokémiai reakcióval vizsgáltuk. Mindkét D-vitaminhiányos csoportban, függetlenül a tesztoszteron-kezeléstől szignifikánsan nagyobb IR-expressziót találtunk az endothel (68. ábra, †, ‡, +: VD+/T+ vs. VD-/T-, #: VD+/T+ vs. VD-/T+ $p < 0,001$) és T.media (69. ábra, ‡, # $p < 0,001$) rétegében is.

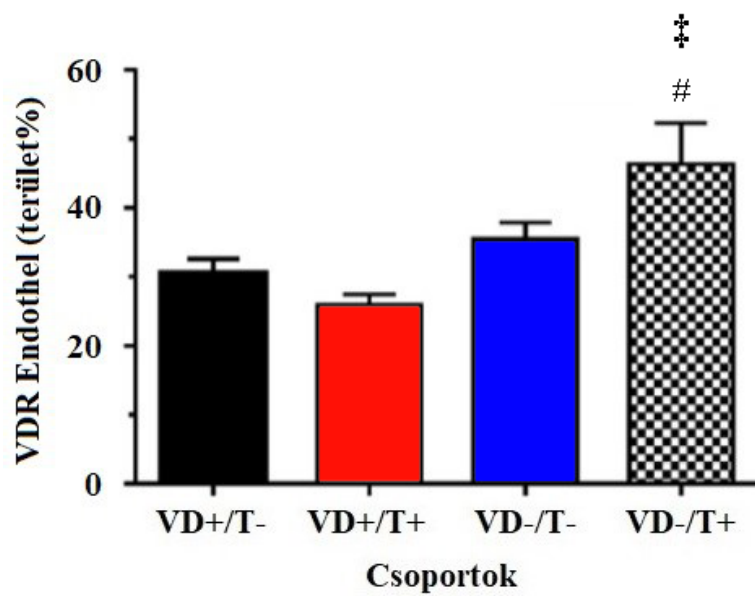


68. ábra: IR IHC-denzitása endothel rétegben

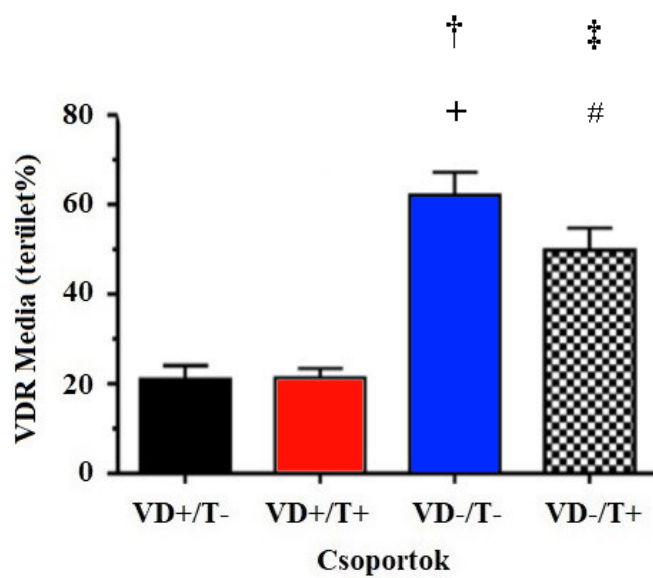


69. ábra: IR IHC-denzitása T.media rétegben

A coronaria arteriolák D-vitamin receptor denzitása szignifikánsan nagyobb volt a D-vitaminhiányos nőstényekben az erek endothel (70. ábra, ‡ $p < 0,05$, # $p < 0,01$) és T.media (71. ábra, †, ‡, +, # $p < 0,001$) rétegében is tesztoszteron-kezeléstől függetlenül.



70. ábra: VDR IHC-denzitása endothel rétegben



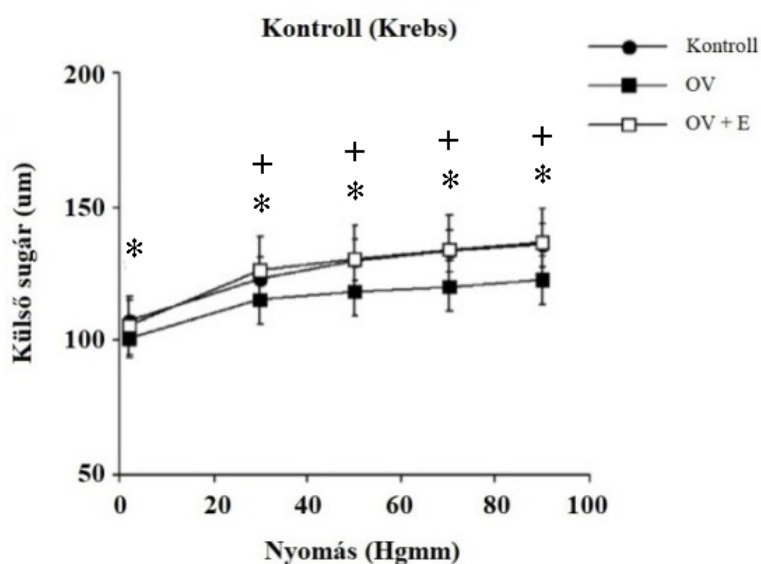
71. ábra: VDR IHC-denzitása T.media rétegben

4.5. Menopauza modellek eredményei (3A és 3B modell)

4.5.1. Intramuralis coronaria-változások hormonhiányban és hormonpótlás mellett (3A1 modell)

4.5.1.1. Az ovariectómia és a HPK hatása a patkány coronaria rezisztencia artériák geometriai-morfológiai tulajdonságaira [65]

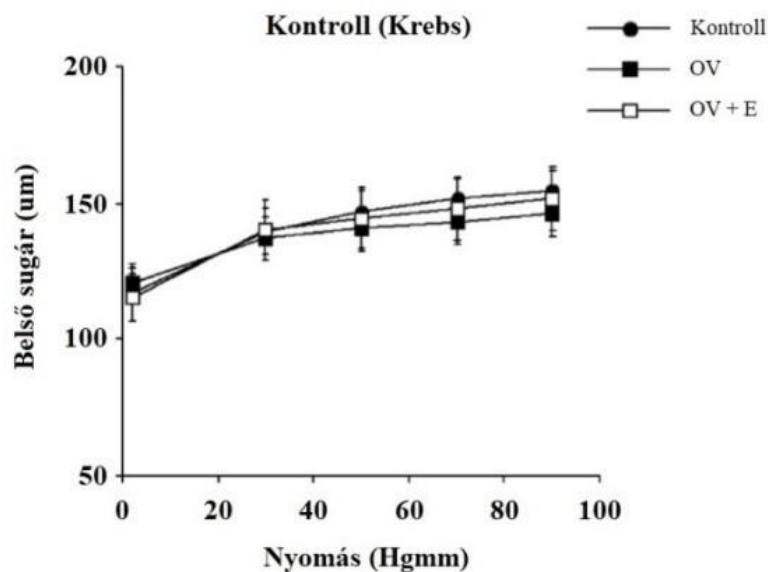
A coronaria rezisztencia artériák in vitro, nKR-ben mért külső sugara szignifikánsan kisebb volt az ovariectomizált csoportban minden nyomásértéken a másik két csoporthoz viszonyítva (72. ábra, *, + $p < 0,05$).



72. ábra: Patkány coronaria rezisztencia arteriolák nKR oldatban mért külső sugara csoportonként (µm).

A csillag: * a kontroll és OV- csoport ($p < 0,05$), míg a kereszt: + az OV és az OV+E csoport ($p < 0,05$) közötti statisztikailag szignifikáns különbséget jelöli.

Ezzel szemben a belső sugár értékei között nem volt szignifikáns különbség a három csoportban nKR-ben (73. ábra, n.s.).



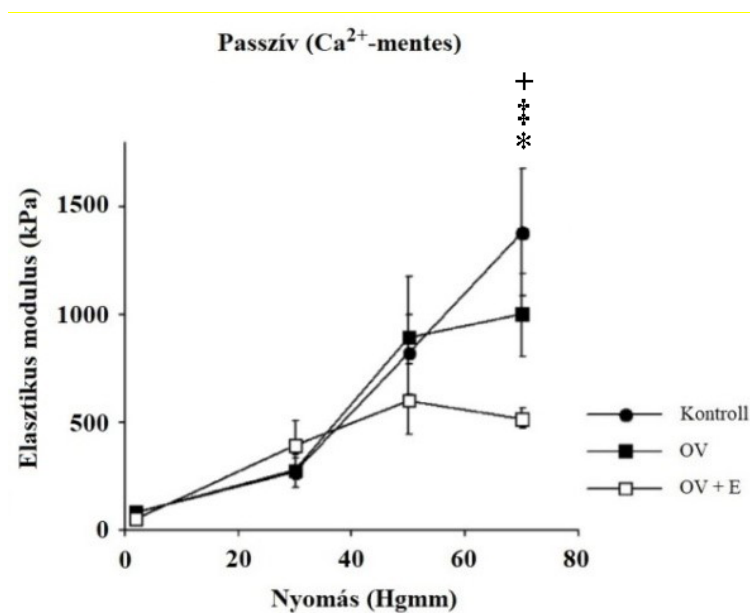
73. ábra: Patkány coronaria rezisztencia arteriolák nKR oldatban mért belső sugara csoportonként (μm).

Az ovariectomizált csoportban mért kisebb külső sugár a szignifikánsan kisebb falvastagság következménye ($p=50$ Hgmm-en: $32,5 \pm 2,4$, $25,4 \pm 2,3$ és $35,2 \pm 2,3$ μm a C, OV és OV+E csoportokban, $p < 0,05$).

4.5.1.2. Az ovariectómia és a HPK hatása a patkány coronaria rezisztencia artériák biomechanikai tulajdonságaira [65]

A falfeszülés (tangenciális stressz) a nyomás függvényében szignifikánsan kisebb volt az OV+E-csoportban a többi csoport értékeihez viszonyítva 50 Hgmm nyomásértékek felett mind nKR mind Ca^{2+} -mentes nKR oldatban ($p < 0,05$). A falfeszülés értékei a következők voltak ($p=50$ Hgmm, nKR oldatban): $20,9 \pm 2,4$, $23,5 \pm 2,8$ és $17,6 \pm 1,6$ kPa^{-1} a kontroll, OV és OV+E csoportokban.

Ca^{2+} -mentes oldatban nem volt különbség a csoportok között az inkrementális disztenzibilitásban. A passzív körülmények között (Ca^{2+} -mentes oldatban) vizsgált elasztikus modulus az OV- és az OV+E-csoportokban is szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoporthoz képest 70 Hgmm nyomásértéken, illetve az OV+E-csoport szignifikánsan kisebb volt, mint az OV-csoport értéke (74. ábra, *, ‡, + $p < 0,05$).

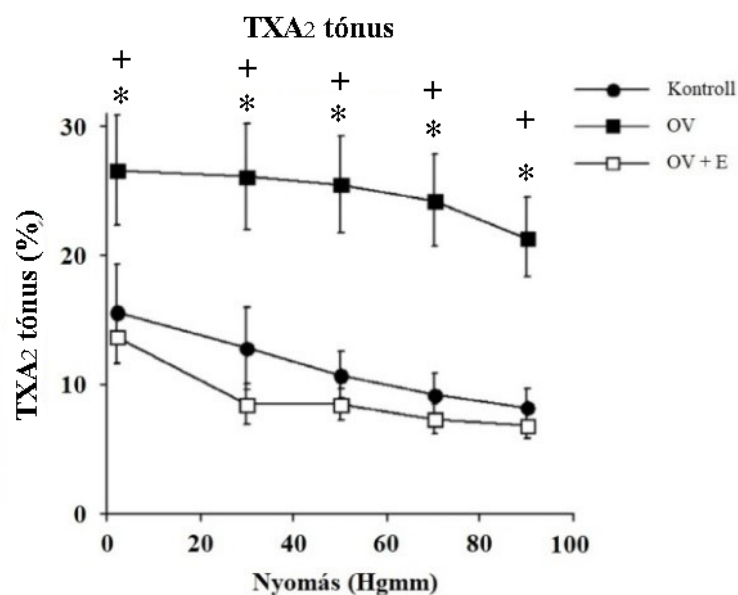


74. ábra: Patkány intramuralis coronaria rezisztencia arteriolák passzív körülmények között vizsgált inkrementális elasztikus modulusa csoportonként. A *-jel a kontroll és OV csoportok ($p < 0,05$), a + az OV és OV+E csoportok ($p < 0,05$), míg a ‡-jel a kontroll és az OV+E csoport ($p < 0,05$) közötti statisztikailag szignifikáns különbséget jelöli.

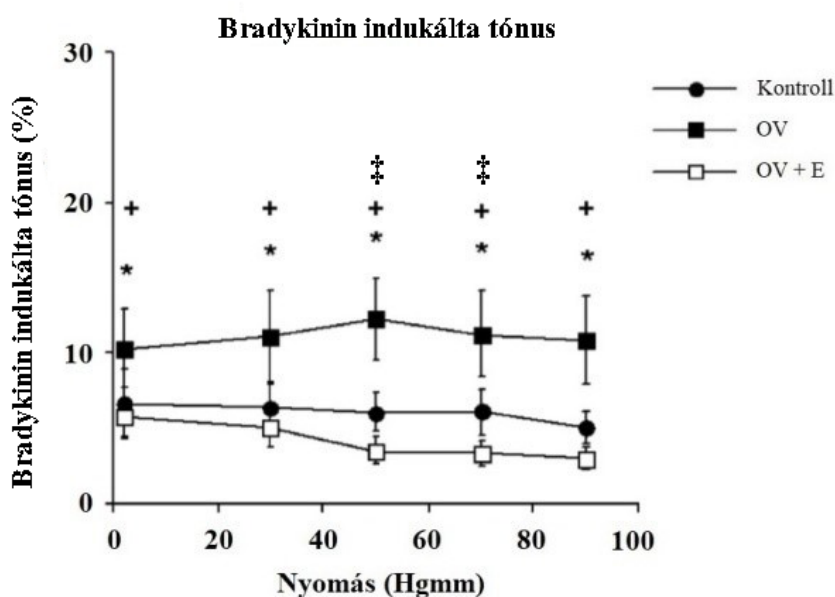
4.5.1.3. Ovariectomia és ösztrogén pótlás hatása patkány coronariák kontraktilitására és endothel funkciójára

A spontán myogén tónus az egyes csoportokban: $7,6 \pm 1,6$ %, $12,8 \pm 2,6$ % és $7,9 \pm 1,5$ % volt. Az ovariectomizált csoport szignifikánsan nagyobb volt a másik kettőhöz képest $p = 50$ Hgmm-en ($p < 0,05$).

Az ovariectomia szignifikánsan, duplájára növelte a coronaria artériák TXA₂-agonista U46619-re bekövetkező kontrakcióját a kontroll csoporthoz viszonyítva (75. ábra, * $p < 0,05$), mely az OV+E csoportban a kontroll szintjére csökkent (75. ábra, + $p < 0,05$ az OV csoporttal szemben és nem szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva). Az OV-csoportban BK jelenlétében a maradék értónus szignifikánsan nagyobb volt (azaz kevésbé relaxált) a többi csoporthoz képest (76. ábra, *, + $p < 0,05$). Az OV+E –csoportban mért vazorelaxáció alacsonyabb nyomásokon a kontroll szintjére tért vissza, 50 és 70 Hgmm-en a kontrollhoz képest is nagyobb mérvű volt (76. ábra, ‡ $p < 0,05$ az OV+E és kontroll csoport értékeit összehasonlítva).



75. ábra: Patkány intramuralis coronaria rezisztencia arteriolák U46619 hatására bekövetkező aktív feszülése (azaz Ca-mentes oldathoz viszonyított maradék értónusa) csoportonként. A *-jel a kontroll és OV csoportok, a + jel OV és OV+E csoportok közötti statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelöli.



76. ábra: Patkány intramuralis coronaria rezisztencia arteriolák BK indukálta tónusa (azaz Ca-mentes oldathoz viszonyított maradék értónusa) csoportonként. A *-jel a kontroll és OV csoportok, a + jel az OV és OV+E csoportok, míg a ‡-jel a kontroll és az OV+E csoport közötti statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelöli.

4.5.2. Akut ösztadiol hatás vizsgálata krónikus hormonhiányban arteria saphenán (3A1 modell)

Az öt hetes kísérlet végén szignifikáns különbség alakult ki a testsúlyokban az OV és az E-csoport értékei között (329 ± 7 vs. 260 ± 4 g). Nem találtunk szignifikáns különbséget az a. saphenák in vivo külső átmérőiben (OV: 405 ± 8 μm , E: 408 ± 10 μm), in vitro 50 Hgmm intraluminális nyomáson, nKR-ben mért külső átmérőkben (OV: 666 ± 10 μm , E: 667 ± 15 μm) és az in vitro NA kontrakció értékeiben (OV: 408 ± 13 μm , E: 408 ± 12 μm) sem.

4.5.2.1. E2 akut relaxáló hatása Ovariectomizált patkányokból származó prekontrahált artériákon

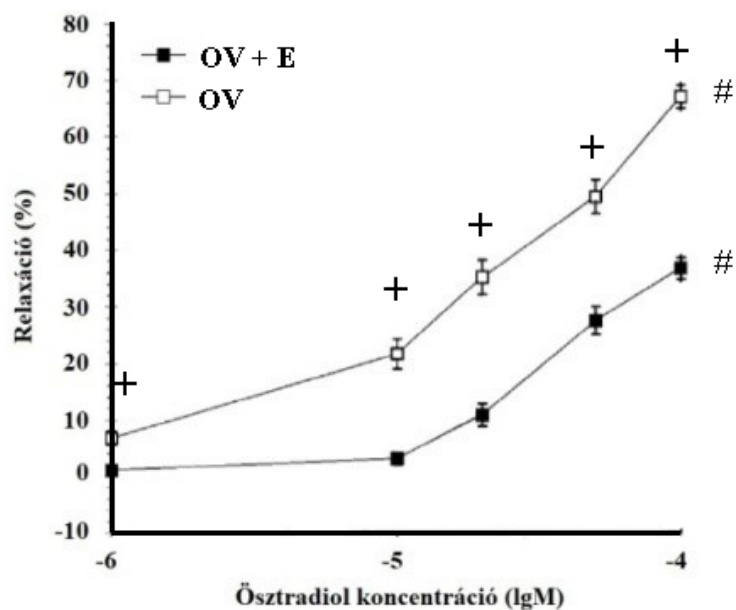
Már 1 μM ösztadiol azonnali és szignifikáns ($6,7\% \pm 2,4\%$) relaxációt idézett elő prekontrahált artériákon. A 10, 20, 50 és 100 μM ösztadiol koncentrációk szignifikáns dózis-függő relaxációt okoztak ($21,6\% \pm 5,3\%$, $35,2\% \pm 6,1\%$, $49,4\% \pm 5,9\%$ és $64,5\% \pm 3,6\%$).

4.5.2.2. E2 akut relaxáló hatása Ovariectomizált, E-kezelt patkányokból származó prekontrahált artériákon

E-kezelt csoportban az 1 és 10 μM ösztadiol nem okozott szignifikáns relaxációt. A 20, 50 és 100 μM ösztadiol koncentrációk azonban már szignifikáns dózis-függő relaxációt indukáltak prekontrahált sapehna artériákon ($10,0\% \pm 3,7\%$, $25,9\% \pm 4,7\%$ és $34,3\% \pm 4,2\%$).

4.5.2.3. A relaxáció összehasonlítása Ovariectomizált és Ovariectomizált, E-kezelt patkányokban

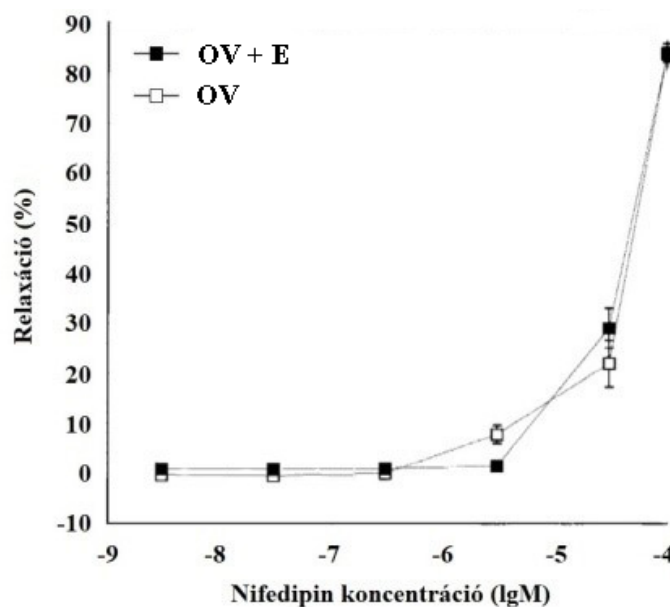
Az akut, ösztadiol-indukált relaxáció szignifikánsan kisebb volt az ovariectomizált, ERT-kezelt csoportban, mint a kizárólag ovariectomizált csoportban. A két dózis-hatás görbe 10^{-4} - 10^{-6} M koncentrációk között statisztikailag szignifikánsan különbözött (77. ábra, + $p < 0,001$), illetve minden egyes koncentráció által kiváltott hatás is statisztikailag különbözött (77. ábra, # $p < 0,05$).



77. ábra: Emelkedő dózisú ösztadiol-indukált relaxáció patkány saphena artériákon ($p < 0,001$)

4.5.2.4. A specifikus akut ösztadiol hatás nem kalcium csatorna mediált

A nifedipin-indukált relaxációk megegyeztek a két csoportban (78. ábra, n.s.).



78. ábra: Emelkedő dózisú nifedipin hatására létrejövő relaxáció patkány saphena artériákon (n.s.)

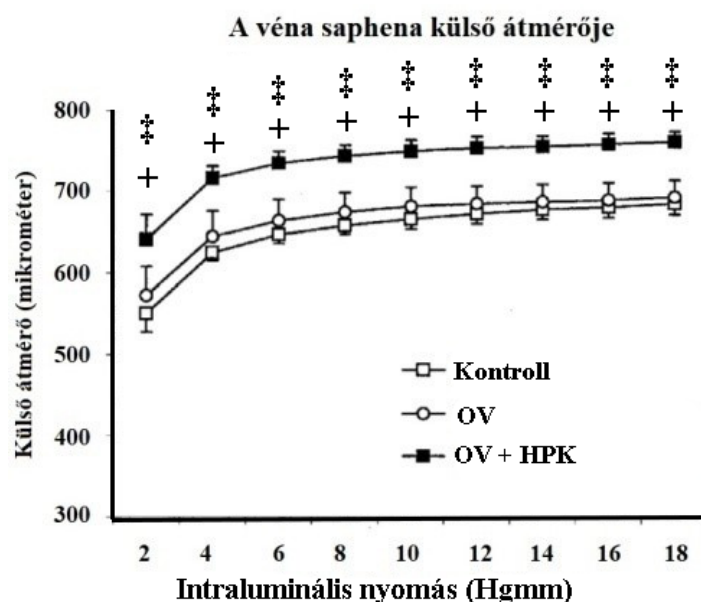
4.5.3. Vena saphena vizsgálata normotóniában (3A2 modell)

A 3 hónapos vizsgálatot követően az állatok testsúlya a következőképpen alakult: kontroll: 254 ± 7 g, ovariectomia: 295 ± 8 g, HPK: 247 ± 5 g. A farmakológiailag ovariectomizált csoport testsúlya szignifikánsa nagyobb volt ($p < 0,01$) a másik két csoporthoz viszonyítva, utóbbiak között viszont nem volt különbség. A hormonhiány szignifikáns testtömeg gyarapodást

eredményezett, melyet a hormonpótlás kivéd, az intakt állatok szintjére mérsékli a testtömeget. Ezt az eredményünket humán viszonyok között klinikai tapasztalatok is megerősítik, változatlan életmód mellett a menopauza elején súlygyarapodást észlelünk, melyet a hormonpótló kezelés megelőz vagy visszaállít.

4.5.3.1. Érgeometriai változások

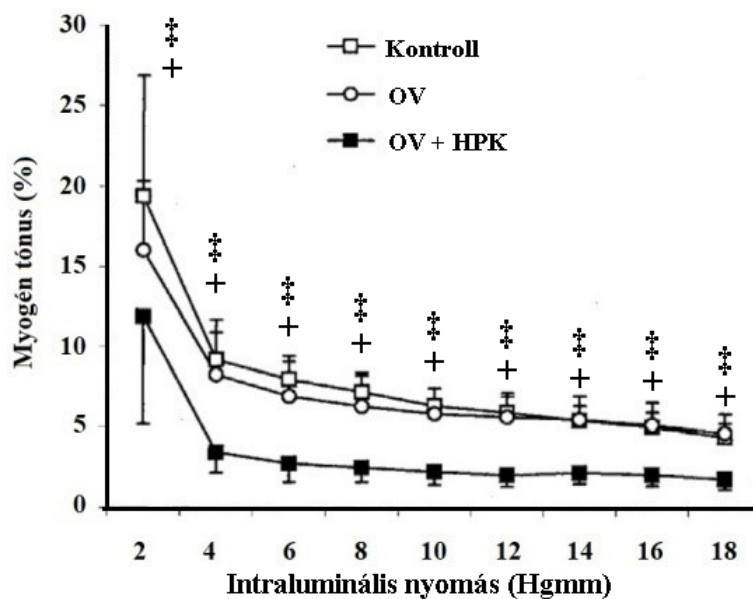
A farmakológiai ovariectomia a testtömegre való normalizálás nélkül nem okozott érátmérő változást. Ugyanakkor a testtömegre normalizálva a külső érátmérő csökkent a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). A kombinált hormonpótló kezelés abszolút értékben is szignifikánsan nagyobb külső átmérőt eredményezett mindkét másik csoporthoz képest. (+, ‡ $p < 0,001$; 79. ábra).



79. ábra: Farmakológiai ovariectomia és HPK-indukálta geometriai változások patkány saphena vénán ($p < 0,001$)

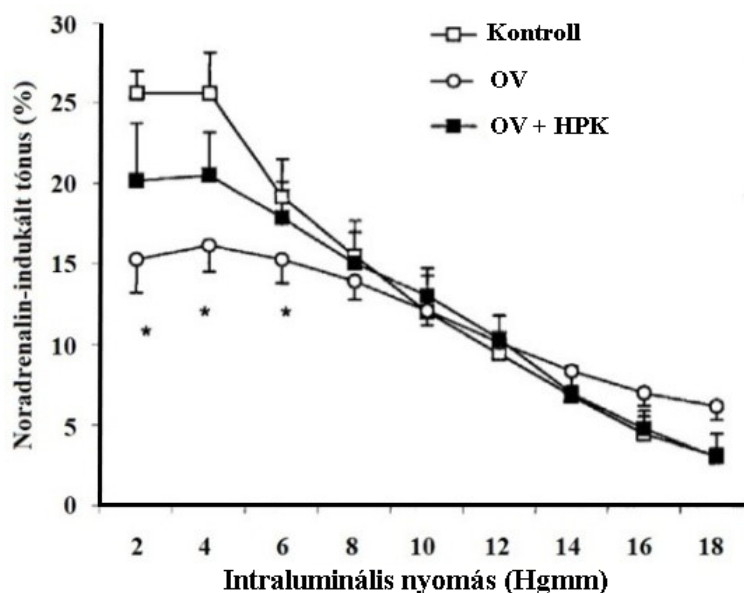
4.5.3.2. In vitro kontraktilitásban bekövetkező változások

Míg a farmakológiai ovariectomia nem befolyásolta a spontán (myogén) tónust ($p = 6$ Hgmm-en kontroll: $8 \pm 1,1\%$, farmakológiai ovariectomia: $6,9 \pm 2,5\%$, p : nem szignifikáns), ezzel szemben a női nemi HPK-kezelés csökkentette ($p = 6$ Hgmm-en: $2,7 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$ a kontroll és a farmakológiai ovariectomizált csoportokhoz viszonyítva is, 80. ábra, +, ‡ $p < 0,05$).



80. ábra: A myogén tónus változása farmakológiai ovariektómia és női nemi HPK-hatására patkány saphena vénákon ($p < 0,05$)

A farmakológiai ovariektómia a fiziológiás nyomástartományban (2-6 Hgmm) szignifikánsan csökkentette a noradrenalin-indukálta tónust (81. ábra, * $p < 0,05$), (6 Hgmm-es P_{IL} , kontroll: $19,2 \pm 2,3$ %, farmakológiai ovariektómia: $15,2 \pm 1,4$ %, $p < 0,05$). Ezt a HPK részlegesen helyreállította (6 Hgmm-es P_{IL} : $17,8 \pm 2,2$ %).



81. ábra: NA-indukálta tónus (vazokonstriktó) változásai farmakológiai ovariectomia és női nemi HPK-hatására patkány saphena vénán ($p < 0,05$)

4.5.4. Vena saphena vizsgálata hipertóniában és hormonhiányos állapotban (3B modell)

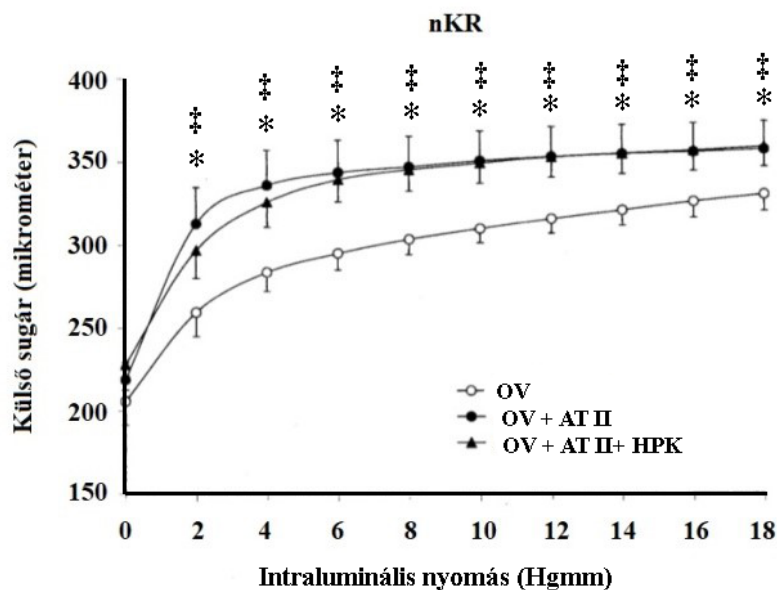
4.5.4.1. In vivo fiziológiai paraméterek

A kísérlet kezdetén a testsúlyok között nem volt szignifikáns eltérés (208 ± 2 g, 210 ± 2 g, 208 ± 3 g az ovariectomizált, az angiotenzin-kezelt hormonhiányos és a hormonpótolt csoportokban.). Egy hónapos kezelési periódust követően az ovariectomizált és az ovariectomizált angiotenzin-II kezelt csoportokban szignifikánsan nagyobb volt a súlygyarapodás, mint az ovariectomizált, angiotenzin II-kezelt (ATII) és hormonpótolt csoportban (103 ± 5 g, 96 ± 7 g, nem szignifikáns, és 52 ± 2 g, $p < 0,001$). Az ovariectomizált állatokhoz viszonyítva, a vérnyomás szignifikánsan magasabb volt az ovariectomizált ATII-kezelt állatokban (92 ± 3 Hgmm vs. 116 ± 5 Hgmm, $p < 0,001$). ATII-kezelt állatokat összehasonlítva elmondható, hogy a vérnyomásban nem mutatkozott szignifikáns különbség a csak ATII-kezelésben részesült és az ATII-kezelésben és HPK-ben részesült csoportok között (120 ± 3 Hgmm, nem szignifikáns az ATII ovariectomizált csoporthoz képest és $p < 0,01$ az ovariectomizált csoporthoz képest).

4.5.4.2. In vivo geometriai paraméterek

Az ovariectomizált állatokat összehasonlítva az ATII-kezelt csoportban a külső sugár szignifikánsan nagyobb volt in vitro nKR-ben mérve. Az ovariectomia és ATII-kezelés

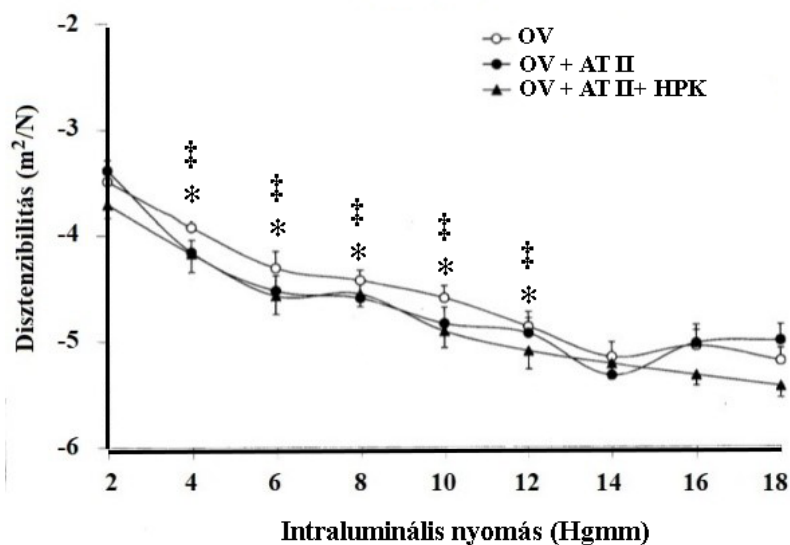
mellett HPK-ben is részesült csoportban nem mutatkozott szignifikáns változás az ATII-kezeléshez képest (82. ábra, ‡: OV vs. OV + ATII + HPK, *: OV vs. OV + ATII $p < 0,001$).



82. ábra: A krónikus ATII-kezelés hatása a külső sugárra hormonhiányban és hormon-pótlás esetén.

4.5.4.3. In vitro érbiomechanika

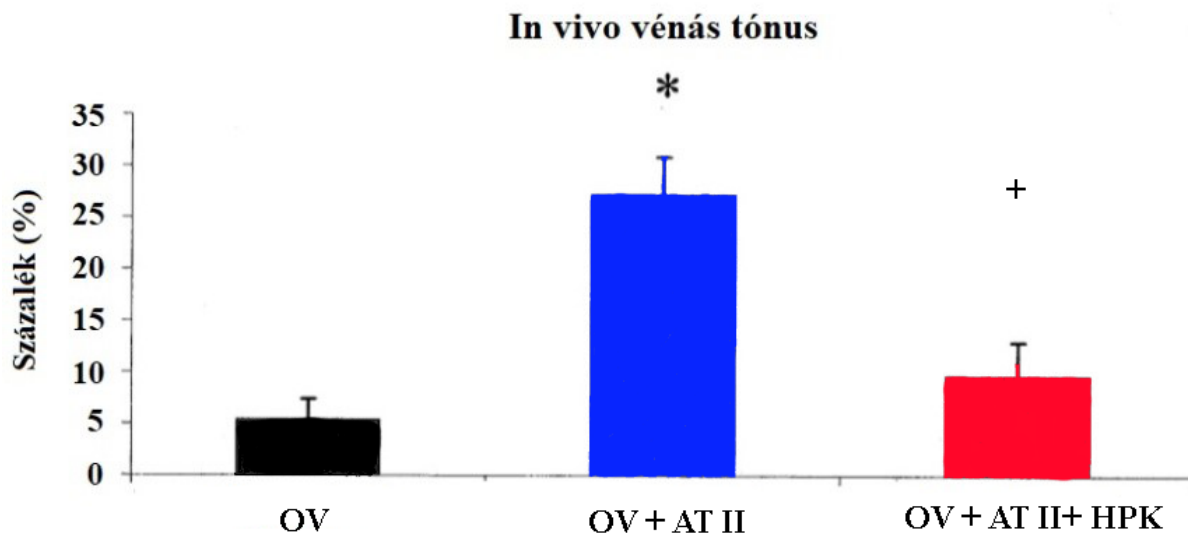
A teljes relaxációban mért vénás disztenzibilitás szignifikánsan kisebb volt az ATII-kezelt csoportokban, mint az ovariectomizált normális vérnyomású csoportban, 4-12 Hgmm között (83. ábra, ‡, * $p < 0,01$), azonban nem találtunk szignifikáns különbséget az ATII-kezelt csoportok között.



83. ábra: A krónikus ATII-kezelés hatása a passzív inkrementális disztenzibilitásra női nemi hormonhiányban és hormonpótlás esetén.

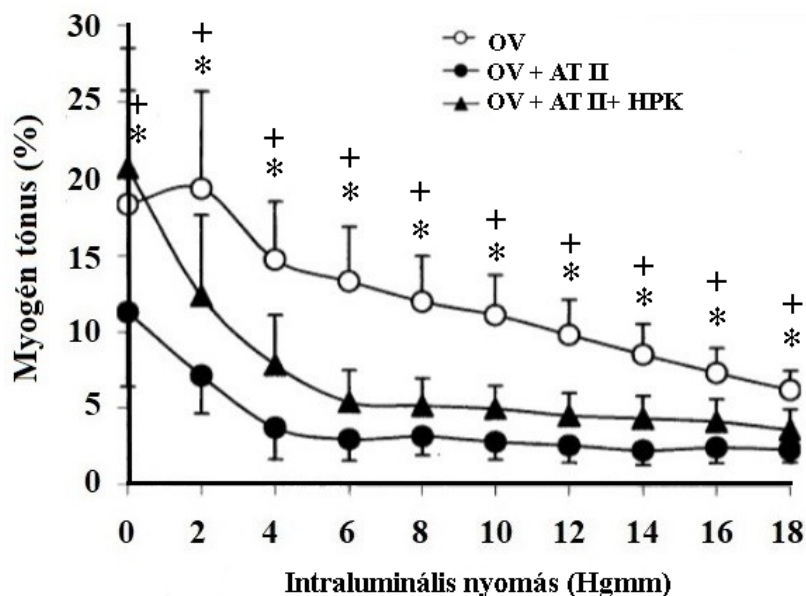
4.5.4.4. In vitro és in vivo kontraktilitás változások

Az ovariectomizált, egyéb kezelésben nem részesült csoporthoz viszonyítva az in vivo vénás tónus szignifikánsan magasabb volt az ovariectomizált, ATII-kezelt állatokban ($5,3 \pm 2,1$ % vs. $27,2 \pm 3,7$ %), (84. ábra, * $p < 0,01$). Az ATII-kezelés mellett HPK-kezelésben is részesült patkányoknak szignifikánsan alacsonyabb vaszkuláris tónusa volt a csak ATII-kezelt állatokhoz képest ($9,6 \pm 3,4$ %), (84. ábra, +: OV + ATII vs. OV + ATII + HPK $p < 0,01$).



84. ábra: A krónikus ATII-kezelés és HPK hatása az in vivo vénás tónusra ovariectomizált patkányokban.

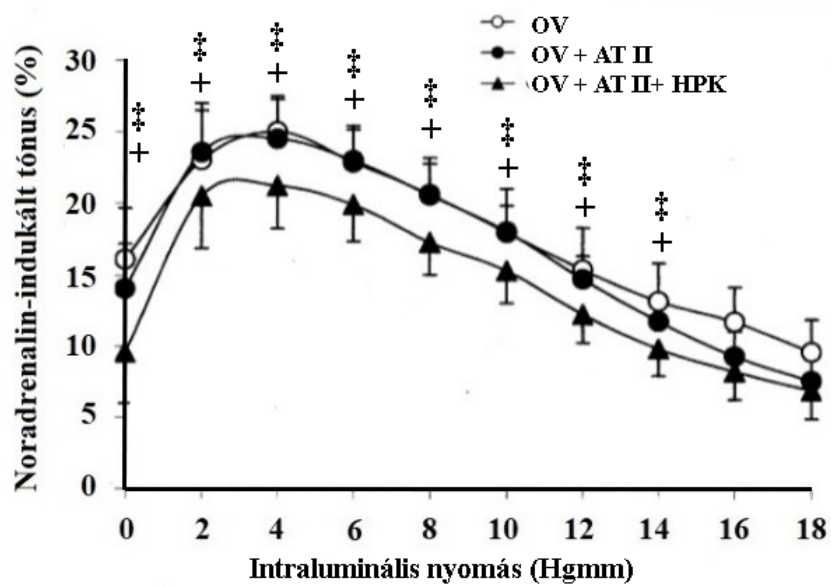
Az in vitro, spontán myogén tónus szignifikánsan csökkent az ovariectomizált, ATII-kezelt csoportban a normotenzív csoporthoz viszonyítva (85. ábra, * $p < 0,001$), ezzel szemben szignifikánsan növekedett a HPK-kezelt csoportban az ovariectomizált, ATII-kezelt csoporthoz viszonyítva (85. ábra, + $p < 0,05$) a teljes nyomástartományban.



85. ábra: Myogén tónus

A noradrenalin-indukálta tónusban nem volt szignifikáns különbség az ovariectomizált és az ovariectomizált, ATII-kezelt csoportokban, azonban a HPK-kezelésben is részesült

csoportban a NA-indukálta tónus szignifikánsan kisebb volt a másik két csoporthoz viszonyítva (86. ábra, +, ‡ $p < 0,001$, 0-14 Hgmm között).



86. ábra: NA-indukálta tónus: a hormonpótolt csoportban szignifikáns tónuscsökkenés látható a másik két csoporthoz viszonyítva ($p < 0,001$)

5. Megbeszélés

5.1. Nemi különbségek coronaria arteriák érreaktivitásában normotóniában és hipertóniában

A szív-érrendszer egyes területeinek működésében ismerünk nemi különbségeket. Tudjuk azt is, hogy a női nem védő hatású a keringési betegségekkel szemben. Ezért munkacsoportunk e nemi különbségek korábban ismeretlen részleteit kívánta feltárni normális vérnyomás, illetve hipertónia esetén.

Ezek az eltérések regionális különbségeket mutatnak egyrészt az erek méretétől, másrészt lokalizációjuktól és funkciójuktól függően.

Ezen vizsgálataink elsősorban a korábban érfiziológiai vizsgálatok számára megközelíthetetlen intramurális kis koszorúerekre irányultak, melyek egyrészt nehezen preparálhatóak, – ennek technikáját Nádasy György tanár úr dolgozta ki és publikálta [63] – másrészt a szív közvetlen vérellátását biztosítják, tehát adaptációs változásaik kulcsfontosságúak az egész szervezet szempontjából.

A normális nemi különbségek megismerését követően a hipertóniás adaptáció eltéréseire fókuszáltuk figyelmünket. Perspektivikusan ezek megértésével lehetővé válik akár nemek szerint eltérő gondolatmenetű kivizsgálás és terápia kialakítása is.

5.1.1. Nemi különbségek élettani viszonyok között

Mind fiziológiás körülmények között, mind kóros adaptáció esetén írtak le humán és állatkísérletes vizsgálatokban szív-érrendszeri eltéréseket a két nem között. E szexuális dimorfizmus érinti az érhálózat tulajdonságait, az erek méretét, azok szövettani szerkezetét, valamint számos funkcionális jellegzetességét [9-12, 73, 74]. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy azonos helyről, korban megegyező, egészséges, normotóniás hím és nőstény patkányokból preparált, hasonló belső sugarú intramuralis coronaria rezisztencia artéria szegmensek között különbségek figyelhetők meg az érgeometriában, elaszticitásban és kontraktilitásban is.

A szív bal kamrájának vérellátásáért legnagyobb részben felelős LAD ágrendszerhez tartozó intramuralis kis coronaria artériák falvastagsága és a falvastagság-belső sugár hányadosa

hímekben nagyobb, mint nőstényekben. A hasonló belső sugár és nagyobb falvastagság alacsonyabb izobárikus falfeszülést eredményezett hímekben, mint nőstényekben.

Krus kisebb intima vastagságot írt le nőkben [73] ahol az 1 mm^2 -re számított myociták átlagos száma hasonló volt mindkét nemből [74]. Mások szövettani vizsgálata nem igazolt szignifikáns nemi különbséget a coronaria vastagsággal kapcsolatban [75].

A hímekből származó erek izobárikus elasztikus modulusa csökkent magasabb nyomás értékeken, míg a disztenzibilitás nőtt fiziológiás nyomástartományban, a nőstényekhez viszonyítva. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a hím coronaria erek rugalmasabbak magasabb intraluminális nyomáson, mint a nőstények erei. Eredményeinkkel ellentétben, a férfiak epicardialis coronaria artériáinak elasztikus modulusát nagyobbak találták, mint a nőké [75]. A csökkent izobárikus falfeszülés talán részben magyarázza a hím érszegmensek csökkent rigiditását. Minthogy a hím coronaria rezisztencia erek elasztikus modulusának logaritmusai kisebbek voltak, még a tangenciális falfeszülés függvényében ábrázolva is, így valószínű különbséget feltételezünk mind a szövetelemek mennyiségében, mind a szövetelemek passzív elaszticitást meghatározó kapcsolataiban. Ez az eltérés is mutatja, hogy az epicardialis erekben végzett vizsgálatok kevésbé megbízhatóak a fő izomtömeget ellátó erek funkciójának előre jelzésében, de ezek direkt vizsgálata preparációs nehézségek miatt korábban nem volt kivitelezhető [63].

Korábban hím coronaria rezisztencia artériákon végzett biomechanikai mérések szerint a nyomásfüggő falfeszülés és az izobárikus elasztikus modulus következményesen csökkent az érhalózat perifériás szegmenseinek irányában, tehát a periféria felé haladva az érfa rugalmasság fokozódott [64].

Az ösztrogén-pótló terápia ovariectomizált patkányok coronaria artériájában növelte a falvastagságot, csökkentette az elasztikus modulus [65] és növelte a disztenzibilitást [76], ennek alapján az ösztradiol direkt coronaria érhatása feltételezhető [77].

Az intramuralis coronaria artériák spontán myogén tónusa hasonló volt mindkét nemből; ugyanakkor a maximális vazokonstrikció kifejezetten erősebb volt hímekben, mint nőstényekben. A nagyobb TXA_2 agonista-indukált vazokonstrikció hímekben részben magyarázható a nőstényekhez képest nagyobb falvastagsággal. Ezzel szemben más a helyzet a gracilis izom arterioláiban, ahol már a myogén válaszból is mutatkozott nemi különbség, ami az ösztrogén hatására nagyobb mértékű NO-felszabadulásnak tulajdonítható [9]. Wellman és munkatársai [78] hímekből izolált vagy ovariectomizált nőstény patkányok coronaria artériái

esetében nagyobb nyomás-indukált myogén tónust regisztráltak, mint intakt nőstény állatok és ösztrogén-pótlásban részesülő patkányok artériái esetében. Knot és munkatársai [10] nőstény coronaria artériákban csökkent myogén tónust mutattak ki, amelyet az endotheliális Ca^{2+} és eNOS regulációban jelentkező nemek közti eltéréssel magyaráztak. Továbbá, Bowles leírta [79], hogy a nem befolyásolja a coronaria simaizomsejtekben létrejövő L-típusú Ca^{2+} áramot miniatűr sertések nagy coronaria artériáiban. A Ca^{2+} -áram feszültség-függő aktivációja negatívabb membránpotenciál irányba tolódott hímekben. A hasonló különbségeket részben magyarázhatja az általunk hímekben kimutatott nagyobb koszorúsér kontraktilitás.

Vizsgálataink során normotenzív állatokból nyert intramuralis coronaria artériák BK-indukálta vazodilatációja nem mutatott nemek közti különbséget. A BK főleg az endotheliumból származó NO-kiáramláson keresztül hatékony vazodilatátor coronaria artériákon [80, 81]. Patkány coronaria rezisztencia artériákban és arteriolákban a BK hasonló NO-függő vazodilatációt eredményez mindkét nemből [81]. Az általunk leírtakat Barber és Miller eredményei is támogatják. Megfigyelték, hogy sertés coronaria artériákban a calcium-függő és calcium-független NO-szintáz aktivitás hasonlóan bizonyult mindkét nemből [82].

A nőstényekhez viszonyítva, a hímek ereiben nagyobb mértékű TXA_2 -indukálta vazokonstrikciót láttunk. A TXA_2 vizsgálatának oka, hogy ebben a vaszkuláris régióban kiemelt fiziológiás szerepet tölt be; az egyetlen olyan coronariákon hatékony érösszehúzó hatású farmakon, amely magasabb koncentrációt is elérhet lokálisan, patológias körülmények között.

A koszorúserek különböző vazokonstriktor válaszkészsége hímekben és nőstényekben összefüggést mutathat a geometriai különbségekkel (megnövekedett falvastagság és kisebb érlumen), a vaszkuláris simaizom eltérő kontraktilitásával, illetve TXA_2 vazokonstriktor érzékenységevel [83-86]. A különbség eredményeink alapján nem vérnyomásfüggő.

Menopauza modellben végzett vizsgálataink alapján [65] az ösztrogénpótlás csökkentette kasztrált nőstény patkányokban a TXA_2 -indukálta vazokonstrikciót intramuralis kis coronaria artériákban. Androgének TXA_2 -érzékenységet fokozó hatását is leírták nagyobb epicardialis coronariákon és perifériás artériákon [85].

Eredményeink klinikai összefüggéseként megemlíthető, hogy humán viszonyok között a coronaria artériákban lévő patogén regulátorok vagy a károsodott vaszkuláris endothelium következtében a vérlemezkéből származó thromboxán kiáramlás illetve az érfal thromboxán termelése fokozódhat. Ilyen körülmények között az intramuralis artériák vazokonstrikciója

(amely a bal kamraizomzat vérellátását meghatározza) valószínűleg férfiakban, illetve hím állatokban nagyobb mértékben fokozódik nőkhöz, illetve nőtények állatokhoz képest. Ismert, hogy coronaria artériákban iszkémia során a vérlemezkékből fokozott TXA₂ kiáramlás figyelhető meg. Ebben az esetben egyéb lokális vazokonstriktor hatások elhanyagolhatóak – modellünk adekvát in vitro tesztnek tűnik ezen klinikai szituáció vizsgálatára.

Az intramuralis coronaria artériák geometriai, elasztikus és kontraktilitásbeli élettani nemi különbségei alapját képezhetik a későbbi kóros adaptációnak. Megértésüket ezért gondoltuk fontosnak.

Ebből kiindulva kívántuk értelmezni a hipertónia nemi különbségeit ATII hipertónia modellben.

5.1.2. A hipertóniás adaptáció nemi különbségei

5.1.2.1. A rágszáló modell célja

Simon nyomán létrehoztunk egy modellt, amelyben alacsony dózisú ATII-vel a hipertónia korai fázisát idéztük elő patkányokban [50, 61, 62]. E modellben megfelelően tudtuk vizsgálni az intramuralis coronaria artériákban bekövetkező korai biomechanikai és farmakológiai adaptációt. Korábbi tanulmányaikból értékes információhoz jutottunk a különböző értípusok esetén használt iniciális hipertónia modellt illetően [64, 87].

Munkacsoportunk vizsgálatait megelőzően publikált eredmények, melyek epicardialis coronariákon születtek, közvetlenül nem adaptálhatóak a bal kamra vérellátásának döntő részét biztosító intramuralis ágakra, mivel az egyes régiókban az eltérő vaszkuláris ág következtében különböző feszülés-triggerelt és lokális véráramlási mechanizmusok lehetnek érintettek [88, 89].

Ugyanakkor e régió direkt, izolált erekre vonatkozó vizsgálatát, mint korábban említettem, annak preparációs nehézségei miatt korábban nem tudták megoldani; ennek technikáját munkacsoportunk publikálta [63]. Ennek lényege az, hogy a szívizom rostok közül speciális mikropreparációs technikával az intramurális kis koszorúerek axiális megrántás, vérzés, és egyéb mechanikai károsodástól mentesen izolálhatóak és szervfürdőben vizsgálhatóak. A technika további fejlesztése révén a teljes LAD ágrendszer in situ vizsgálata, térképezése („mapping”) is lehetővé vált [90]. Ez tette lehetővé ennek a régióknak a részletes érgeometriai, -biomechanikai és –farmakológiai, illetve hálózati adaptációs szintű vizsgálatát. A korábbiakban egyéb régiók eredményeit extrapolálták szívre. Hiszen tudjuk, hogy a könnyen

hozzáférhető zsigeri erek (pl. a. mesenterica ágrendszere), a vázizom és vese erek hipertóniás adaptációja részben eltérő. Ezért volt fontos e régió ereinek direkt tanulmányozása, mely önmagában is mutatott érreaktivitásbeli különbségeket az erek rendűségének, méretének megfelelően [81].

5.1.2.2. Nemi különbségek intramuralis coronaria arteriolák hipertóniás adaptációjában

Hímekben a hipertóniás kóros adaptáció során éppen az a nemi jellegzetesség, különbség változik először, amely normális vérnyomás esetén valamelyest kompenzálta az ösztrogén értágító hatásából adódó előnyt a női ereket szempontjából. Ugyanis az intramurális kis koszorúerek érfali mechanikai terhelés növekedése hímekben az egyik korai károsodás az adaptációban. Ezzel szemben a nőstények ereiben „inward eutroph” remodelling látható, mely stabilizálni próbálja a mechanikai terhelést, ugyanakkor nő a vaszkuláris rezisztencia – de ennek árán stabilizálódik a mikrocirkulációban a vérnyomás, tovább fenntartva lokálisan a normotóniás szintet. A relatív szívtömeg növekedése ugyanakkor a szívizom hipertrófia kialakulásának nagyobb esélyét vetíti előre a nőstény állatokban.

A vazokonstriktor reaktivitás fokozódása hímekben jelzi a coronariák sérülékenyebbé válását patológiás állapotokban, pl. szívinfarktus esetén.

Az alkalmazkodás eltérő logikája egyértelmű nemi különbségeket mutat a koszorúerekben a hipertóniás adaptáció első lépései során.

Részleteiben áttekintve a biomechanikai eredményeink azt mutatják, hogy nőstényekben a falvastagság növekedett, ami kevesebb relatív mechanikai terheléshez vezetett, míg hímekben az érfal rigidebbé vált és kevésbé mutatott hipertrófiát, ugyanakkor a mechanikai terhelése nőtt. A hipertóniás adaptációs mechanizmusok azt mutatják, hogy míg nőstényekben a mechanikai terhelés optimalizálása az elsődleges, addig hímekben a legfontosabb az érfal vastagodás megelőzése volt. Jelen eredményeink összevethetőek későbbi, patkány arteria cerebri anterioron végzett, normotóniás D-vitaminhiányon és pótláson alapuló vizsgálatainkkal [91], ahol D-vitaminhiányban hímekben normális vérnyomás mellett is már prehipertenzív elváltozások mutatkoztak, részben hasonlóan, részben eltérően az angiotenzin indukálta változásoktól, mivel azonos külső érátmérők mellett a falvastagság és a falvastagság/lumen átmérő hányados szignifikánsan nőtt a D-vitaminhiányos állatokban, így már normotóniában hipertrófiás remodelling alakult ki [91].

A nemi különbség lényege az angiotenzin hipertóniás kísérletünkben biomechanikai szempontból, hogy bár nőstény coronariákban nyilvánvaló volt a fal hipertrófiája a falfeszülés

normalizálása érdekében, hímekben a domináns kompenzációs lépés az érfal merevségének növekedése volt. SHR patkányokban, Bonacasa és munkatársai [92] a coronaria artériák csökkent remodellingjét figyelték meg ovariectomián átesett, metoxiösztadiol kezelésben részesült nőtény és intakt hím patkányokban.

Az előzőekben leírt mechanizmust az ATII hipertóniás modellben kiegészítheti az a tény, hogy a nyomásterhelés közvetlenül hatással lehet a szív mikroérhálózatára és károsíthatja azt, ami részben magyarázhatja a myocardialis infarktusok és a mechanikai eltérések nemi különbségeit. A nőtényekhez képest hímekben megnövekedett spontán értónust figyeltünk meg. Az értónusban leírt különbség megmaradt maximális TXA₂-konstrikció és BK-relaxáció esetén is; az értónus működési tartománya mindkét nemben hasonló volt, de hímekben ez az érték a kontrakció irányába mozdult el.

A TXA₂-indukálta vazokonstrikció mértéke hímek intramuralis coronaria artériáiban nagyobb mérvű volt, mint a nőtényekében. A TXA₂ erős vazokonstriktor hatással rendelkezik coronaria artériákon és magas koncentrációt érhet el iszkémia során, míg egyéb vazokonstriktorok hatástalannak bizonyulnak vagy nem érnek el kellőképpen magas koncentrációt a vazokonstriktor hatás eléréséhez. Az érösszehúzókra látott korlátozott válaszkészség a koszorúerek egyik önvédő tulajdonsága. Ehhez képest a TXA₂ az egyetlen vazokonstriktor, mely viszonylag erős hatással rendelkezik coronaria artériákon [81].

A TXA₂ hatásában megjelenő nemi különbséget kimutatták epicardialis coronaria artériákon is. A másodlagos mesenterialis artériák TXA₂-kontrakciója erősebb, mint a fő ágaké [64, 87]. A coronaria érálózat különböző szegmensei eltérő vazokonstriktor reaktivitás mutattak [64]. A hosszútávú angiotenzin-kezelés hipertóniához és hipertrófiás átalakulásokhoz vezet a kardiovaszkuláris rendszerben. Ezek a hatások túlnyomórészt angiotenzin I receptor közvetítésével jönnek létre: vazokonstrikció, vazopresszin indukció, vaszkuláris simaizom sejtproliferáció, szimpatikus idegrendszeri aktiváció, valamint a szív fokozott kontraktilitása [93]. Az angiotenzin emellett az adaptív immunitás változásain keresztül elősegíti az ateroszklerózis folyamatát [94], mely szintén mutat nemi különbségeket; hímekben / férfiakban a célszervekben és az erekben az oxidatív stressz nagyobb mérvű, egyes vélemények szerint kiemelten a mieloperoxidáz aktivitás a célszervi szövődmények független rizikófaktorának is tekinthető [95]. Humán tanulmányok is felvetik a nemi jellegzetességek alapján, hogy a férfiak és a nők hipertóniáját eltérő, specifikus irányelvek szerint kellene kezelni [96].

Stabilizálódó ATII hipertóniában hímeiben fokozott vazokonstriktációt, nőstényekben fokozott érfali remodellinget figyeltünk meg.

Hasonló jelenséget láttunk korábbi tanulmányaink során, míg normotenzív hímeiben nagyobb érösszehúzódot lehetett kiváltani [49], addig a spontán myogén tónust illetően nem mutatkozott különbség [71]. Így hipertóniás hímeiben „morfológiailag fixált vazokonstriktáció” mutatkozott, mivel nőstényekben a remodeling elért egy egyensúlyi állapotot (kompenzatórikus érfal hipertrófia a nagyobb nyomásterhelés ellen). Hasonló irányú változásokat találtunk D-vitaminhiányos állatmodellünkben is a cerebri anterioron [91]. Úgy gondoljuk, hogy ezeket a különbségeket a tesztoszteron és az ösztrogén szintek különbségei okozzák, illetve befolyásolják [97].

Nőstény patkányokból izolált vaszkuláris simaizom sejtek kisebb kontrakcióval válaszoltak különböző stimulusokra, mint a hímeiből izolált sejtek [98], valamint ismert az is, hogy az ösztradiol hatására az AT1R-expresszió csökken [99]. Emellett az ösztradiol kezelés és a női nem serkenti az endotheliális NO-kiáramlást és a vazodilatációt. Ez a hatás coronaria artériákon is megfigyelhető, még hipertónia esetén is [11, 100, 101]. A coronaria artériák legfontosabb lokális vazodilatátorai a BK és az adenosin. Vizsgálataink során BK-t használtunk, mely hatására ATII-infundált nőstény patkányok endotheliális coronaria dilatációját nagyobb volt a hímekhez képest. Az acetylcholine a coronaria artériák méretétől és az érágak szintjétől függően eltérő hatásai lehetnek rágcsálókban [81, 102], ezért nem használtuk kísérleteinkben.

5.1.2.3. Nemi különbségek a szívtömegben hipertóniában

Az ATII hipertónia modellben nőstényekben a szívizom hipertrófiáját figyeltük meg, míg ez az eltérés hímeiben nem jelentkezett. Normotóniás kísérletünk még publikálatlan adatai alapján [71], normotenzív állapotban nem volt nemi különbség ($0,324 \pm 0,018$ g/100 g testsúly hímeknél vs. $0,319 \pm 0,023$ g/100 g testsúly nőstényeknél), tehát ez a hipertóniás állatok relatív szívsúlyában kialakult különbség az eltérő hipertóniás adaptáció következménye. Hipertrófiás átalakulás csak a nőstények szívizomzatában jelentkezett, míg coronaria artériáiban nem. A relatív szívtömeg növekedése arra utal, hogy a szívizomzat alakult át, beleértve a szívtömeget (hipertrófia) és a szív ereket. Az angiotenzin-függő hipertónia adaptációjában látott mechanizmusok eltérő dominanciája felveti annak lehetőségét, hogy a gyógyszeres kezelésre való érzékenységekben is lehetnek nemi különbségek.

5.1.2.4. A hipertóniás nemi különbségek összegzése

Összefoglalva kijelenthető, hogy az ATII-dependens hipertónia korai fázisaiban markánsan különböző adaptációs mechanizmusok jelentkeznek hímekben és nőstényekben. Míg nőstényekben a vaszkuláris reaktivitás megtartott volt az érfal remodeling és a relatív szívtömeg-növekedés ellenére is, addig hímekben a fokozott mechanikai terhelés megelőzte az átalakulást ebben a stádiumban. A fokozott konstriktor reaktivitás védő szerepet játszhat, mivel védheti a szöveteket a fokozott perfúziós nyomásterheléstől, viszont rizikófaktorként is viselkedhet infarktus esetén helyi vazokonstrikció illetve trombusok kialakításában.

5.2. PCOS modellekben nyert eredményeink megbeszélése

5.2.1. Korai PCOS modellünkről (2A modell)

Az alkalmazott kísérletes modell a PCOS adekvát patkánymodellje [51, 67]. A 8-12-hetes DHT kezelés megegyezik azzal, amelyet alkalmaztunk PCOS indukálására és szignifikáns, körülbelül háromszorost növekedést okozott az androgén szintekben nőstény patkányokban [51]. Yanes számos metabolikus eltérést észlelt: 90-napos kezelés során: a patkányok spontán proteinuriájában növekedést, morfológiai vesekárosodást, emelkedett TGF- α , leptin és koleszterin szinteket tapasztalt [67]. Normál E2 szint ellenére, DHT-kezelt állatokban az ösztrusz ciklus megszűnt. Szignifikáns testsúlynövekedést tapasztaltak, amely ebben a kísérletben is jelentkezett és lehet az adiponektin-receptor expresszió androgén-függő növekedése és az alacsony szérum adiponektin szint következménye [103, 104]. A testsúlyra gyakorolt hatást a D₃-vitamin kezelés nem befolyásolta. Az emelkedett vércukor és inzulin szint alapján Yanes feltételezte, hogy a hiperandrogén nőstény patkányokban inzulin-rezisztencia alakul ki [67]. Ezt eredményeink is támogatják, mivel a kontroll állatokhoz képest háromszoros növekedést észleltünk OGTT-t követően a 2-órás inzulin értékében és egyéb cukor / inzulin vagy metabolikus eltérést nem találtunk. Ennek alapján kísérletes modellünk alkalmas volt a korai, kezdeti anyagcsere és vaszkuláris károsodások vizsgálatára, mivel 2-es típusú cukorbetegség és hipertónia még nem alakult ki, ugyanakkor az OGTT 2-órás inzulin értékei inzulin-rezisztenciát igazoltak DHT kezelést követően. Ezt a korai szénhidrát-anyagcserezavart a D₃-vitamin kezelés megelőzte.

Yanes és mtsai által alkalmazott hosszabb távú, 90-napos DHT-kezelés hipertóniát okozott [67], 70-napos kezelésünk során normális vérnyomásúak maradtak a DHT kezelt állatok is. Ennek alapján megállapítható, hogy a tapasztalt változások közvetlenül a hiperandrogén állapot illetve a hiperinzulinémia/inzulin-rezisztencia következményei és függetlenek a vérnyomástól. 90-napos kezelés során Yanes és mtsai a patkányokban ismerten jelen lévő spontán proteinuriában növekedést, morfológiai vesekárosodást, emelkedett TGF- α , leptin és koleszterin szintet detektáltak, melynek hátterében a fokozott oxidatív stresszt és NADPH oxidáz 4 expressziót találtak [67]. Ezen metabolikus eltérések az erek farmakológiai válaszkészségére is hathatnak.

5.2.2. Morfológiai és érbiomechanikai változások arteriolákon

A humán policisztás petefészek szindróma modellezéseként ivarérett nőstény patkányokban alkalmazott 10 hetes DHT-kezelés [51, 67] szignifikáns arteriola változásokat indukált kísérleteink során. A nőstény patkányok krónikus DHT-kezelése következtében az a. gracilis érátmérője megnőtt, de ezt nem kísérte a falvastagság változása. Markáns csökkenést mértünk a szegmensek NA-függő kontrakciójában és myogén tónusában. A DHT-kezelt csoportban az endothel-függő és az inzulin-függő relaxáció is csökkent.

A krónikus D₃-vitamin kezelés visszafordította a morfológiai remodellinget: helyreállította az érátmérőt és fokozta a NA-indukált kontrakciót, de a myogén tónus és az endothel-függő relaxáció csökkenését nem kompenzálta, ugyanakkor D₃-vitamin kezelt állatokban az inzulin-kiváltotta relaxáció a kontroll szintjére tért vissza.

A vázizom arteriolák jelentős farmakológiai reaktivitásbeli változását észleltük; a teljes adaptációs tartomány (a maximális kontrakció és relaxáció közti különbség) szignifikánsan csökkent a DHT-kezelés hatására. Bár a D₃-vitamin kezelés szignifikánsan növelte ezt a tartományt, nem érte el a kontroll csoport szintjét. DHT-kezelést követően a háttérben a NA-válasz szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. Ezt a D₃-vitamin kezelés nagyrészt helyreállította. DHT hatására mérséklődött a relaxáció is, amelyet egyidejű D₃-vitamin kezelés alkalmazása tovább csökkentett. Tehát a DHT-kezelés a mindkét irányban mérsékelte az adaptációs tartalékokat. A DHT mellett alkalmazott D₃-vitamin kezelés fokozta a farmakológiai reaktivitást de csökkentette az erek spontán tónusát, még a kontrollhoz viszonyítva is, azaz a teljes alkalmazkodási tartomány mérsékelt növelésén belül relaxáltabb állapotú ereket eredményezett.

Elsőként vizsgáltuk kísérletes PCOS modellben a rezisztencia artériák adaptációjának részleteit és mutattuk ki, hogy ezek a változások részben ellensúlyozhatók D₃-vitaminnal, amely egyre gyakrabban alkalmazott adjuváns terápia PCOS-ben.

Nőstény patkányok krónikus DHT-kezelése – amely a humán PCOS egyik állatmodellje – szignifikáns változásokat indukált a vázizom arteriolák biomechanikai tulajdonságaiban. A relaxált lumen kitágult, de ezt nem kísérte a falvastagság illetve a faltérfogat növekedése, tehát eutróf remodelling alakult ki. Ezt emelkedett falfeszülés és az izobárikus disztenziilitás növekedése kísérte. Az elastikus modulus nem változott, ami azt mutatja, hogy kezdetben a passzív elastikus rész átalakulása, azaz az érfal markánsabb átépülése nem alakul még ki.

A D₃-vitamin PCOS-ben adjuváns terápiaként használatos [105] és az alacsony dózisú D₃-vitamin kezelés kardiovaszkuláris protektív hatása széles körben elfogadott [52, 106, 107]. Eredményeink azt mutatják, hogy a D₃-vitamin képes ellensúlyozni a morfológiai remodellinget, az emelkedett falfeszülést és disztenziibilitást rezisztencia ereken.

Eredményeink alapján a DHT-kezelés hatására alapvető változások jelentkeznek a kis rezisztencia erek biomechanikájában; az arteriola fal rugalmatlanabbá válása mellett fokozódott a tangenciális falfeszülés a kontrollhoz viszonyítva, tehát az erek mechanikai terhelése növekszik. Passzív körülmények között a D₃-vitamin kezelés teljesen helyreállította az érfal biomechanikai egyensúlyát.

A 70 napig alkalmazott DHT-kezelés vérnyomás emelkedést még nem okozott, azonban az állatokban észlelt tangenciális falfeszülésbeli és disztenziibilitásbeli különbségek prehipertenzív elváltozásoknak tekinthetők – különös tekintettel annak ismeretében, hogy 90 napos kezelés már hipertóniát eredményezett. Az arteriola fal megnövekedett mechanikai terhelése lehet az egyik lokális tényezője a kialakuló hipertónia önrontó körének. Tehát a munkacsoportunk 70 napos modelljében tapasztalt érbiomechanikai változások közvetlenül a hiperandrogén állapotnak vagy a modellünken is kimutatott hiperinzulinémának/inzulin-rezisztenciának tulajdoníthatóak [108]. Ismert, hogy PCOS-ben a vaszkuláris biomechanikai funkciók rosszabbak. Lakhani és mtsai csökkent arteria carotis interna pulzatilitási indexet és magasabb kardiovaszkuláris rizikót találtak PCOS-s nőkben [109]. Megnövekedett intima-media vastagságot észleltek a carotis communis és femoralis artériákban 35 év alatti betegekben. Ismert, hogy PCOS-ben a nagy artériák kevésbé rugalmasak és merevebb fallal rendelkeznek; a carotis communis artéria merevsége és intima-media vastagsága növekszik és disztenziibilitása csökken [25, 110, 111]. Ezek a változások inkább a hiperandrogén állapottal állnak kapcsolatban, mint az obezitással [110]. A coronaria artériák kalcifikációja is fokozódott [25], és növekedett a boka-kar index, valamint a pulzushullám terjedési sebesség [112], tehát az ateroszklerózis korai kialakulása és a fokozott kardiovaszkuláris rizikó a hiperandrogén állapot következményének tekinthető [25, 112]. Soares és mtsai szerint az egyéb rizikófaktoroktól független kardiovaszkuláris rizikó korai növekedése a PCOS része [111]. PCOS-ben a vaszkuláris biomechanikai károsodás alapvető és gyorsabban progrediál, mint az átlag populációban [25] és az alkalmazott kezelési módok módosítják e rizikót [113, 114]. A magas hormontartalmú fogamzásgátlók fokozhatják, a metformin kezelés csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót [114], míg a kis dózisú fogamzásgátlók valószínűleg nem befolyásolják számottevően [113, 115]. Agarwal és mtsai leírták, hogy a metformin csökkenti

az artéria merevséget, az aorta és a. brachialis pulzushullám sebességet, valamint az aorta augmentációs indexet [113]. A hipertónia kockázat fokozódása részben a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszeren keresztül valósul meg, így ezzel a mechanizmussal is befolyásolható gyógyszeres kezeléssel (pl. angiotenzin receptor blokkoló, spironolacton) [116]. PCOS-ben a D-vitamin is elfogadott adjuváns kezelés [105] és kis dózisban kardiovaszkuláris protektív hatással rendelkezik [52, 106]. Munkacsoportunk vizsgálta először a D₃-vitamin artériák mechanikai tulajdonságaira gyakorolt hatásait PCOS modellben. A D-vitamin-kezelt csoportban a tangenciális falfeszülés nem növekedett – ez valószínűleg lokális védő hatásnak tekinthető a kiserek szintjén a hipertónia kifejlődése ellen. Kísérletünk eredményei azt mutatják, hogy PCOS-ben a D₃-vitamin kezelés adjuváns terápiaként alkalmazva lassíthatja az artériák érbiomechanikai károsodását és kombinációban alkalmazva fokozhatja a metformin érvédő hatását. A D-vitamin e hatását magyarázhatja az elasztin komponensek fokozott proliferációja, amelyet *in vitro* aorta simaizom sejteken igazoltak [117]. A D₃-vitamin kezelés főként az arteriolák prehipertenzív morfológiai remodellingjét előzte meg. E kezelés elkülönítendő a nagy adagú, D-vitaminnal kiváltott ateroszklerózis modellektől (78.000 NE/tápkgtól kezdően), melyek dózistartománya az érvédő dózisonál közel két nagyságrenddel nagyobb.

5.2.3. Gracilis arteriolák farmakológiai reaktivitása

A vázizom arteriolák jelentős farmakológiai reaktivitásbeli változását észleltük.

Az endothel-függő relaxáció értékelését követően következtethetünk arra, hogy a legfontosabb vazorelaxáns a kontroll csoportban a nitrogén-monoxid (NO), amelyet a DHT-kezelés gátolt. Az L-NAME által okozott NO blokádnál DHT-kezelt nőstény patkányok arterioláira nem volt hatással. A D₃-vitamin kezelés kontrakció-csökkentő hatása független a NO-útvonaltól, mivel az NO-blokád a D-vitamin kezelt állatokban is kiesett / jelentősen csökkent. További vizsgálatok szükségesek a D-vitamin hatás pontos mechanizmusának tisztázására – bár aorta gyűrűkön végzett vizsgálataink alapján a prosztanoid út érintettsége valószínűsíthető [118].

A bekövetkezett változások a hiperandrogén állapotnak, illetve a kezelés által indukált hiperinzulinémiának/inzulin-rezisztenciának köszönhetőek [108]. Eredményeinkhez hasonlóan Kravariti szignifikáns csökkenést észlelt mind az endothelium (áramlás-mediált), mind a simaizom-függő (nitrát-mediált) vazodilatációban PCOS-s nőkben egészséges kontrollokhoz képest [119]. A csökkent áramlás független meghatározója az inzulin-

rezisztencia, a hiperandrogén állapot és a koleszterin szint volt. Megállapította, hogy a 20-as éveiktől kezdve PCOS-ben elhízás-független endothel károsodás jelentkezik, valamint megnő a rizikójuk kardiovaszkuláris betegségek korai kialakulására [119].

Az áramlás-mediált vazodilatációt számos kutatócsoport tanulmányozta, akik vagy hasonló eredményeket találtak vagy egyáltalán nem találtak különbséget a PCOS betegek és az egészségesek között, attól függően, hogy milyen módon és melyik populációt vizsgálták. Különbségeik abból is adódhattak, hogy nem volt egységes a PCOS kritériumrendszere, volt aki csak a komplett fenotípust vizsgálta, de volt, aki mind a négyet, illetve regionális-etnikai különbségek is közrejátszhattak az eredmények diverzitásában [115, 120]. Ezt a látszólagos ellentmondást Cussons oldotta fel, aki kimutatta, hogy a vaszkuláris károsodás fokozatosan fejlődik ki; a legkorábbi az áramlás-mediált vazodilatáció csökkenése, normál artéria érfal merevség mellett [121]. Tehát e korai (valószínűleg a beteg 20-30-as éveit során kezdődő) és fokozatos változások megjelenése lehet az első lépés a hipertónia és a metabolikus szindróma kialakulásának irányában [121].

A D₃-vitaminhiány nagyon gyakori, PCOS esetében ez általában jelentős mérvű, ezért pótlása illetve célértékre történő korrekciója hasznos PCOS-ben [35, 36, 105, 122]. Az alacsony dózisú D₃-vitamin kezelés kardiovaszkuláris protektív hatása széles körben ismert [52, 106]. Vizsgálatunk eredményei azt mutatják, hogy a D-vitamin-kezelés lassítja a PCOS-ben megjelenő jellegzetes érkárosodásokat. Kísérletünket megelőzően már ismert volt, hogy a D₃-vitamin analógok befolyásolják a nemi hormonok vaszkuláris hatásait [123]. A krónikus D₃-vitamin kezelés csökkentette a vérnyomást SHR patkányokban, valamint izolált artériáikban a vazokonstriktor választ; ezt a hatást a csökkent COX₁ expresszióval magyarázták, míg az intracelluláris kalcium szint változatlan maradt [106]. D₃-vitamin hiányban emelkedett vérnyomást, valamint mesenterialis artériákban csökkent endothel-függő dilatációt és myogén tónust detektáltak [124].

Konklúzió

Vizsgálatunkban elsőként mutattuk ki a vázizom arteriolák vaszkuláris biomechanikai adaptációjának részleteit PCOS modellben. Eredményeink szerint a hiperandrogén állapot rigidebb, kevésbé rugalmas arteriola fal kialakulásához vezet. Relaxált erekben a D₃-kezelés a kontroll szintre javította a fal disztenziabilitást és mechanikát. Összegzőképpen, az arteriolák patológiás, prehipertenzív, biomechanikai adaptációját észleltük ebben a PCOS modellben, amelyet az egyidejű D₃-vitamin kezelés nagyrészt megelőzött.

A PCOS-ben jelentkező vaszkuláris reaktivitásbeli változásokat a krónikus D₃-vitamin kezelés kisereken részben ellensúlyozza. A spontán és nyugalmi vaszkuláris tónusban bekövetkezett csökkenés mellett, a simaizom-függő kontrakció, valamint a teljes relaxáció megközelítette, illetve elérte a kontroll szintjét. Azonban a D₃-vitamin kezelés nem befolyásolta a DHT-kezelés által blokkolt NO-útvonalat. Tehát az általunk észlelt relaxáció-kompenzáció eltérő útvonalon valósult meg – aortán végzett vizsgálataink alapján felmerül a prosztanoidok lehetséges szerepe.

5.2.4. Aorta gyűrűk farmakológiai reaktivitása

Elsőként számoltunk be a nagy erek korai funkcionális változásairól és az egyidejű D₃ vitamin (kalcitriol) kezelés hatásairól PCOS patkánymodellben. DHT-kezelést követően az aorta NA-indukálta kontrakciója fokozódott. Ezt a hatást a szimultán alkalmazott kalcitriol kezelés csökkentette.

Az ACh-indukálta relaxáció intenzívebb volt a kontroll állatok aortáiban, mint a két DHT-kezelt csoport esetén. Az ACh relaxáció csökkent a DHT-kezelt állatokban és kalcitriol kezelés hatására sem közelítettek a relaxációs értékek a kontroll csoportéhoz. Azonban, L-NAME inkubációt követően, a DHT-csoportok aorta gyűrűi kontraháltak maradtak, és az egyidejű kalcitriol-kezelés szignifikánsan javította a relaxációt.

Az indometacin inkubáció csökkentette a tónust a különböző kezelési csoportokban, azaz konstriktor hatást blokkolt. Feltételezzük, hogy az ACh relaxáció különbségeinek kialakulásához hozzájárulnak a prosztanoidok; a megváltozott konstriktor/dilatátor prosztanoid egyensúly kompenzációs mechanizmusként, illetve kiinduló károsodásként is jelentkezhet. Utóbbira utal, hogy a DHT+D₃-kezelt csoport aorta gyűrűiben az ACh-relaxáció során megnövekedett NO-relaxációt ellensúlyozták a konstriktor prosztanoidok.

70-napos DHT-kezelés kezelés során vérnyomásváltozás nem volt még megfigyelhető, azaz már normotenzív állapotban megnövekedett a kontraktilitás és csökkent az ACh-függő relaxáció, melyek prehipertenzív elváltozásoknak tekinthetők az aorta gyűrűkön. Keller és mtsai 90-napos kezelést követően már kialakult hipertóniában mesenterialis artériákon észleltek hasonló elváltozásokat [125]. Vizsgálataink során a relaxációs tartalékok nagyfokú kimerülését tapasztaltuk, ami szintén hozzájárulhat a hipertónia kialakulásához. D₃-vitaminnal kezelt patkányokban részleges kompenzáció volt tapasztalható.

PCOS-ben szignifikáns farmakológiai reaktivitás változások, valamint a nagyerek mechanikai károsodása fejlődik ki [25, 109]. Kravariti hasonló eltéréseket írt le a simaizom- és endothel-függő relaxációban [119], háttérében az inzulin-rezisztenciát és a hiperandrogén állapotot egyaránt független rizikófaktoroként azonosította.

A kiserek reaktivitásának értékelésekor áttekintettem, hogyan hatnak a PCOS-ben alkalmazott egyes kezelések a vaszkuláris reaktivitásra és a kardiovaszkuláris kockázatra. Aortán végzett vizsgálataink előtt nem volt ismert az sem, hogy a D-vitamin hogyan befolyásolja a vaszkuláris adaptációt, illetve a konstriktor és vazodilatátor stimulusra adott farmakológiai válaszkészségét PCOS-ben a nagyerek szintjén.

Korábban Weishaar és Simpson D-vitamin hiányos hím patkányok aorta gyűrűinek fokozott vazokonstrikcióját észlelte [126], amely D₃-vitamin kezeléssel visszafordítható volt. Ez a hatás idő és dózisfüggő – 9-hetes hiányállapot után jelentkezett és 6 hét pótlást követően már nem volt mérhető [126]. Hasonló növekedést tapasztaltunk a hiperandrogén nőstény patkányok aorta gyűrűinek kontraktilitásában, amelyet a hosszabb (10-hetes), és az androgén kezeléssel egyidejűleg alkalmazott kalcitriol kezelés kiegyensúlyozott. Vizsgálatunk fontos eredménye, hogy a PCOS modellben alkalmazott adjuváns D₃-vitamin kezelés késleltetheti a nagyerek prehipertenzív károsodásának kifejlődését. Ennek alapján kombinációban alkalmazva támogatja a metformin érvédő hatásait. Fernandes és mtsai szerint egyéb vitaminok is hasznos kiegészítői lehetnek e kombinációs kezelésnek a metabolikus háttérű androgénfüggő érkárosodások ellensúlyozásában [127].

A DHT-kezelés csökkentette a rezisztencia erek NA-indukálta kontrakcióját, az ACh-, valamint az inzulin-indukálta dilatációját. A kalcitriol kezelés helyreállította az inzulin relaxációt és a NA-indukálta éresszehúzdást, ellenben az NO-függő relaxációra nem volt hatással [108].

Vizsgálatainkban elsőként írtuk le, hogy PCOS patkánymodellben aortán a NA hatására kialakuló fokozott kontrakció részlegesen ellensúlyozható szimultán alkalmazott kalcitriol-kezeléssel. Emellett az ACh-függő vazorelaxációt a kalcitriol nem befolyásolta, valószínűleg a fokozott NO-függő relaxációt semlegesítő konstriktor-posztanoid hatás miatt. Eredményeink alapján a hiperandrogén állapot prehipertenzív érelváltozásokat okozott és a vazorelaxációs tartalékok kimerülését eredményezte aortán. A kalcitriol kezelés a DHT-kezelés következtében fokozott konstriktor reaktivitást helyreállította és részben ellensúlyozta az aorta prehipertenzív elváltozásait.

5.2.5. Szexuálissteroidok érhatásai és interakcióik

Eredményeink értékelésekor a krónikus hiperandrogenizmus direkt érhatásait szintén figyelembe kell venni. Az androgének meghatározó, közvetlen vaszkuláris hatása a vazorelaxáció. Dózisfüggő módon a DHT és a T egyaránt gátolja az L-típusú felszültségfüggő kalcium csatornákat, míg a T magas koncentrációban direkt vazorelaxációt indukál: Ca-antagonista hatású és fokozza a cAMP-termelést hím patkány aortában [128]. Ehhez hasonlóan, az ösztadiol kalcium csatorna blokkoló vazorelaxáns hatását írták le patkány aortában fenilefrin-előkezelést követően [129]. Ugyanakkor krónikus, kis dózisú T kezelés fokozta a myocardialis iszkémia [130], a diszlipidémia és az inzulin-rezisztencia rizikóját, elsősorban metabolikus- és krónikus érhatásokon keresztül [131]. A progresszív ateroszklerózis ellenére a krónikus T kezelés fokozta az ACh-ra jelentkező endotheliumfüggő relaxációt ovariectomizált nőstény majmokban, bár nem befolyásolta közvetlenül a Nitroprusszid-Na által kiváltott simaizomfüggő relaxációt [132]. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer eltérései PCOS-ban sokrétűek [116]. Yanes emelkedett intrarenalis angiotenzinogén szintet és angiotenzin-1-konvertáz enzim expressziót, valamint csökkent angiotenzin II receptor 1 expressziót észlelt hiperandrogén nőstény patkányokban [67]. Humán kísérletekben mikrovaszkuláris diszfunkciót; az ACh-függő vazodilatációs válasz csökkenését igazolták PCOS-ben [133]. Kimutatták, hogy az endothel károsodást az emelkedett gyulladásos és szolubilis aktivációs markerek fokozzák [134]. Paraoxonáz-1 és az áramlás-mediált dilatáció az endothel diszfunkció használható prediktorai voltak [120]. Férfiakban a krónikus androgén kezelés hatásai jelenleg vita tárgyát képezik. Egyrészt ezek a hatások fajspecifikusak, másrészt viszont a különböző androgének valószínűleg eltérő hatásokat válthatnak ki. Emellett felmerül annak a lehetősége is, hogy androgén hiányban a pótlás előnyös, viszont a fiziológiás szint fölé pótolva inkább káros hatásokat tapasztalunk.

Modellünkben az inzulin dózis-hatás görbét követően a D₃-vitamin-kezelt csoport NA-érzékenysége változatlan maradt. A kontroll és a DHT-kezelt csoportokban a kimosást követően az első NA-kontrakcióhoz képest a második alatt 20%-os kontraktilitás-növekedés volt megfigyelhető. A D₃-vitamin-kezelt csoport első és második NA-kontrakciói között nem volt különbség, ami arra utal, hogy a D₃-vitamin-kezelés fokozza a NA-érzékenységet. A legjelentősebb inzulin-függő relaxáció a D₃-vitamin-kezelt csoportban mutatkozott. Az inzulin-függő relaxációt az ACh-relaxációval összehasonlítva határozott szignifikáns különbségek jelentkeztek. A kontroll csoportban az ACh erősebb relaxációt eredményezett, mint a másik két kezelt csoportban. Továbbá ez a különbség L-NAME blokádnál mellett is

változatlan maradt vagy fokozódott. Ez arra utal, hogy az inzulin relaxáló hatása kevésbé függ a NO-tól gracilis arteriolákban, valamint a D₃-vitamin a NO-rendszertől független mechanizmussal állítja helyre a normális vaszkuláris tónust. Humán izom arteriolákban az inzulin relaxációban az NO mellett [135, 136] a Na⁺-K⁺ ATPáz is szerepet játszhat [137, 138]. Luis nyúl renalis efferens arteriolákon is leírta az inzulin relaxáció NO-független mechanizmusát [139]. A fizikai aktivitás növelte az inzulin által stimulált véráramlást K(Ca²⁺)-csatornák aktiválásával bőr arteriolákban [140]. Eredményeink alapján a DHT-kezelés valószínűleg részben csökkenti a NO-mediált relaxációt, mivel csökkent az ACh-relaxáció is. A NO-útvonal blokkolásával kisebb érösszehúzódás alakult ki, amely a prosztanoid rendszer [106, 141] és a muszkarinos ACh-receptorok [142] lokális részvételére utalhatnak. Kimutatták, hogy nagyerek (aorta) és a gracilis arteriolák inzulin-függő relaxációja túlnyomórészt NO és endothel-eredetű hiperpolarizáló faktor/K⁺-csatornák által mediált [143].

Számos szerző feltételezte, hogy az alacsony szérumszintű D₃-vitamin szerepet játszik a PCOS-ben megfigyelt inzulin rezisztenciában, amely D₃-vitamin pótlással javítható [144]. 2-es típusú cukorbetegségben a D₃-vitamin fokozta az a. brachialis áramlás-függő vazodilatációját [107]. Az utóbbi tanulmány a D₃-vitamin kezelés direkt vaszkuláris hatását észlelte: az a. brachialis áramlás-függő dilatációja szignifikánsan csökkent alacsony szérumszintű betegekben. A fentiek ismeretében a D₃-vitamin hiperandrogén körülmények közötti hatásainak értelmezésekor figyelembe kell vennünk a D₃-vitamin direkt vaszkuláris hatásait, a DHT-val való interakcióit, valamint a javuló inzulin rezisztencia által okozott indirekt vaszkuláris hatásait. A D₃-vitamin kezelt patkányokban a NA-indukált kontrakciók stabilitása a D₃-vitamin vaszkuláris reaktivitást megőrző szerepét bizonyítja. Patkány aortán végzett vizsgálatok alapján a D₃-vitamin szerepet játszik a vaszkuláris reaktivitás fenntartásában, mivel a dihidrotesztoszteronhoz és az ösztadiolhoz hasonlóan fokozza a kreatin kináz (CK) aktivitását, - ugyanakkor permisszív hatású a szexuáliszteroidok érhatai vonatkozásában, mivel D-vitaminhiányban sem a DHT, sem az E₂ nem volt képes fokozni a CK-aktivitást [123]. A fokozott VEGF-expresszió szintén részt vehet a D₃-vitamin krónikus érvédő hatásai kialakításában [145].

A patkányokban DHT-indukált PCOS modell a fő kritériumokat illetően hasonló a humán PCOS-hez, azaz policisztás ovariumok alakultak ki és 8-12-hetes DHT kezelést követően az androgén szintek háromszorosára emelkedtek [51, 67]. A hiperandrogén állapot erekre kifejtett direkt hatásait is figyelembe kell venni. Malkin és mtsai munkája alapján az akut

tesztoszteron-kezelés vazodilatációt indukál, míg a krónikus kezelés csökkentette az endothelium-függő és endothelium-független vazorelaxációt és növelte a NA-indukált vazokonstrikciót [146].

Gonzales és mtsai tesztoszteron-előkezelést követően a tromboxán-indukált tónusban növekedést észleltek [141]. Torres az aorta nemi hormonok érreaktivitás-szabályozását vizsgálta metabolikus-szindróma hím patkány modelljében. A tesztoszteron endothel diszfunkciót okozott és a kasztráció, valamint a kasztrált állatoknak adott ösztadiol protektív hatását észlelte [147]. A krónikus androgén hatások között említendő az a maradandó epigenetikai változás, hogy in utero DHT hatásra nőtény utódokban a megszületést követően szívmű hipertrófia kifejlődését észlelték [16].

Az ösztrogén vazodilatátor hatásai is lehetnek endothelium-függőek és -függetlenek, genomiálisak és nem genomiálisak [11]. Az ösztrogén receptorok az érfal összes rétegében jelen vannak: az endotheliumban, a simaizomban és az adventitiában is [148]. Az ösztrogén értágító hatása in vivo és in vitro jól ismert. Patkány aortában a hatás részben az endotheliumon keresztül valósul meg, főleg a NO-függő relaxáció fokozása révén; illetve részben Ca-antagonista hatásként az érsimaizomsejteken jött létre. A különböző vazokonstriktorok hatása eltérő mértékben csökkent a krónikusan és az akutan adagolt ösztadiol hatására [149]. Kísérletünkben az ösztrogén károsodott vazorelaxáns hatását észleltük krónikus DHT kezelést követően. Még kialakult a vazorelaxáns hatás, de lényegesen csökkent hiperandrogén patkányokból származó aortákon. New [150] eredményei szerint az ösztrogén előnyös kardiovaszkuláris hatásai nem alakulnak ki hiperandrogén állapotban. A kontroll férfi csoporthoz viszonyítva nem találtak különbséget az artériás compliance-ban, a vérnyomásban, a koleszterin szintben és a kardiovaszkuláris rizikóban az ösztadiol-kezelt Male-To-Female transzsexuálisokban. Eredményeink összhangban állnak New eredményeivel. Fentiek mellett Li és mtsai azt találták, hogy az hormonhiány csökkenti a TXA₂ és a PGI₂ termelődését is nőtény patkány aortában (beszűkül a vaszkuláris adaptációs tartomány), míg intakt hímekben, nőtényekben és ösztrogén pótoló ovariectomizált állatokban is azonos szinten megtartott megtartott mindkét prosztanoid termelődése [151].

A D-vitamin érfunkcióra gyakorolt hatása régóta vizsgált terület. 6 hetes D-vitamin kezelés a kontroll Wistar Kyoto patkányok szintjére csökkentette a prosztanoid-dependens vazokonstrikciót SHR-ben, az endothelium-függő 6-keto-prostaglandin F₁α-mediált vazokonstrikció csökkentése révén [106]. A SHR patkányokban a D-vitamin kezelés hatására csökkenő vérnyomás és vazokonstrikció nem állt kapcsolatban az intracelluláris Ca²⁺

egyensúllyal, de korrelált a kezelés hatására csökkenő reaktív oxigén szabadgyökök mennyiséggel és COX₁ expresszióval [106]. Emellett Wong és mtsai beszámoltak az ACh függő relaxáció növekedéséről [106]. E hatások miatt feltételezik a D₃-vitaminhiány szerepét a hipertonia patomechanizmusában [106]. A D-vitamin hatásban mutatkozó különbségek magyarázhatók a vizsgált erek vagy fajok illetve a D-vitamin és a DHT-kezelés hatására kialakuló fokozott prosztanoid kontrakció [125] közti kölcsönhatás következményeinek különbözőségeivel. Nőstény állatokban a D-vitamin hatásainak értékelésekor figyelembe kell vennünk a D-vitamin direkt vaszkuláris hatásait, az ösztradiollal és a DHT-val való interakcióját, valamint a megnövekedett szisztémás inzulin rezisztenciára gyakorolt indirekt vaszkuláris hatásait, bár az utóbbi patkány aorta esetében az inzulin-függő relaxációval kapcsolatban neutrálisnak bizonyult.

Konklúzió

Elsőként vizsgálatuk a gracilis arteriolák és az aorta vaszkuláris adaptációját és inzulin szenzitivitását PCOS modellben. Eredményeink szerint a hiperandrogenizmus által okozott vazorelaxáció csökkenés részben NO-függő. Kísérletes modellünkben a D₃-vitamin helyreállította gracilis arteriolák szisztémás inzulin választ, a NO-független inzulin-indukált relaxációját, valamint a NA-érzékenységet. Elsőként igazoltuk a gracilis arteriolák és az aorta egyidejű vaszkuláris inzulin rezisztenciáját és a D₃-vitamin lokális különbségeket mutató ellensúlyozó hatását kísérletes PCOS modellben.

Eredményeink szerint a D-vitamin patkány aortán tapasztalt nettó neutrális hatása magyarázható a helyi konstriktor prosztanoidok és egy NO-független relaxációs mechanizmus mérsékelt változása közti egyensúllyal. Aorta gyűrűkön a két legfontosabb mechanizmust vizsgáltuk, amely a normál vaszkuláris tónusért felelős. Azonban egyéb reakció utak vizsgálata is szükséges a jövőben. Elsőként figyeltük meg ugyanazon károsító és kompenzációs mechanizmusok eltérő dominanciájának lehetőségét, a mikro- és makroerekben kialakult vaszkuláris károsodás különbségeinek hátterében.

Az ösztrogén relaxáció hiperandrogén környezetben jelentősen csökken patkány aorta ringeken és ezt a D-vitamin kezelés nem befolyásolta. Az ösztrogén érvédő hatásának csökkenése és a vaszkuláris inzulin rezisztencia kialakulása lehet a magyarázata a PCOS-ben jelentkező korai kardiovaszkuláris károsodásnak.

5.2.6. Az inzulinra adott érválaszok regionális különbségei

A humán policisztás szindróma modellezéseként ivarérett nőstény patkányokban alkalmazott 10 hetes DHT-kezelés [51, 67] során a gracilis arteriola inzulin-indukált relaxációja csökkent. A krónikus D₃-vitamin kezelés helyreállította az inzulin-kiváltotta relaxációt, mely a kontroll szintre tért vissza. Bár humán PCOS-ben és DHT-kezelt nőstény állatokban megnövekedett szisztémás inzulin rezisztencia előzőleg már leírásra került, az inzulin jól ismert vazodilatátoros aktivitását, és a vaszkuláris inzulin rezisztencia kialakulását vizsgálatainkat megelőzően még nem tanulmányozták. Emellett a D₃-vitamin kezelés rezisztencia arteriolákra kifejtett hatása – amely javítja a hiperandrogén állapotban kialakuló károsodásokat és az inzulin rezisztenciát – szintén ismeretlen volt.

Az inzulin-függő dilatáció csökkenése az inzulin rezisztencia vaszkuláris manifesztációja. Az érkárosodások logikája alapján felmerült bennünk annak a lehetősége, hogy a vaszkuláris inzulin rezisztencia mutathat regionális különbségeket. Ezt kiderítendő, vizsgáltuk a jelenséget aorta gyűrűkön – mely egyúttal lehetővé tette a háttér mechanizmusok részletesebb vizsgálatát is. Ennek során megállapítottuk, hogy a gracilis arteriolákhoz hasonlóan a DHT kezelés csökkentette a patkány aorta gyűrűk inzulin-függő relaxációját is. Ugyanakkor a szisztémás inzulin rezisztenciával és az arteriolák lokális inzulin-függő relaxációjával ellentétben, a D₃-vitamin kezelés nettó hatása aorta ringeken neutrálisnak bizonyult – nem állította helyre az inzulin-függő relaxációt; a hiperandrogén állapot által okozott vaszkuláris inzulin rezisztencia aortán megmaradt.

Az öregedéssel kapcsolatban a metabolikus és vaszkuláris inzulin rezisztencia között hasonló kapcsolat volt megfigyelhető [152]. Mivel a D-vitamin hatása a mikro- és makroereken különböző [108, 153], lehetséges, hogy ennek hátterében a különböző értípusokban az inzulinnal összefüggő vazodilatációs mechanizmusokban bekövetkező eltérő változás vagy az egyes közvetítő mechanizmusok közötti arány-eltolódás állhat.

Egy korábbi publikáció alapján [153] ismert volt, hogy az inzulin-függő vazorelaxáció kulcsmechanizmusa a NO-út vonal. Ennek alapján kísérletünk során L-NAME-mel blokkolva a NO hatást, csökkent vazorelaxációt tapasztaltunk a kontroll aortákban. Eredményeink azt mutatják, hogy a DHT-kezelés elsősorban a NO-függő relaxáció károsításán keresztül csökkentette az inzulin-függő relaxációt. A NO-út vonal blokkolását követő maradék relaxáció azt mutatja, hogy egyéb relaxációs útvonalak is részt vesznek ebben a folyamatban. A D-vitamin-kezelés aortán csökkentette a DHT-kezelés által indukált, NO-független (L-NAME

jelenlétében kialakult) inzulin relaxáció csökkenést; azonban nem változtatott szignifikánsan a teljes inzulinfüggő relaxáción, az egyidejűleg ezzel közel egyező mértékű prosztanoidfüggő vazokonstrikció fokozódás miatt.

Korábbi tanulmányok a COX-gátló indometacin mérsékelt vazorelaxáns hatásait írják le aortán [154], ezek az eredmények összhangban állnak megfigyeléseinkkel, miszerint mérsékelt növekedés következett be az összes csoportban az aorta vazorelaxációban. Érdekes módon, indometacin előkezelést követően a DHT csoportokban mért inzulin-indukált vazorelaxáció csökkenés az egyidejűleg D-vitamin kezelt csoportban részlegesen helyreállt. Tehát az indometacin csökkentette az aorta konstriktor tónusát, ez a hatás erősebb volt a DHT+D₃ csoportban, mint a DHT-csoportban. Előzőleg Keller [125] rezisztencia ereken a prosztanoid-dependens vazokonstrikcióban bekövetkezett növekedésről számolt be 90-napos DHT-indukált PCOS patkánymodellben. Ezzel összhangban kísérletünkben is további növekedést találtunk a prosztanoid vazokonstrikcióban az egyidejűleg D-vitaminnal is kezelt csoportban.

Összességében úgy gondoljuk, hogy az inzulin relaxációan a krónikus D-vitamin kezelés lokális hatására a NO-független relaxációban bekövetkezett részleges növekedést a konstriktor prosztanoid hatásokban bekövetkezett növekedés ellensúlyozza aortán, míg ez a lokális mechanizmus elhanyagolható lehet gracilis arteriolon, ahol az inzulinfüggő relaxációt a krónikus D-vitamin kezelés a kontroll szintjére állította vissza.

5.2.7. Oxidatív stressz PCOS modellben aortán

Kísérleteinkben elsőként vizsgáltuk hiperandrogén környezet, valamint a D₃-vitamin kezelés összefüggéseit az oxidatív stresszel: a DHT-indukálta PAR választ, a PAR poli(adenozinfoszfát-ribóz) akkumulációt, különböző szervekben.

Immunhisztokémiai vizsgálataink alapján ovariumban és leukocitákban a PAR-válasz nőtt a DHT-kezelt állatokban és a D₃-vitamin, mint ismert PARP gátló kezelés [155] ezt szignifikánsan csökkentette. De az aorta endotheliumban és vaszkuláris simaizomban a PAR-válasz szignifikánsan csökkent a DHT-kezelés hatására és a D₃-vitamin ezt már nem módosította. Hasonló regionális különbséget az inzulin PARP aktivitásra gyakorolt hatásában is igazoltak [156]. Ez a regionális különbség a DHT specifikus kompenzációs védő hatása lehet – ahogyan azt Xu leírta HUVEC kultúrán [157]. Az oxidatív stressz enzimek –kaspáz-3 és -9 – aktivitásában DHT előkezelést követően csökkenést észlelt endothel sejtekben [157],

azaz ennek alapján a hiperandogén állapottól függetlenül, a DHT valószínűleg direkt PARP gátló hatással is rendelkezik.

A PARP aktivitásnak számos endogén és exogén szabályozó faktora van, beleértve az ösztrogént és a D-vitamin aktív formáját, mint PARP inhibitor [155], ezeket számos klinikai állapotban vizsgálták. Munkacsoportunk a PAR aktivációt tanulmányozta PCOS rágszáló modelljében. PCOS-ben a kardiovaszkuláris rizikó fokozott a kedvezőtlen hormonális-hiperandogén, metabolikus, prediabéteszes és gyulladásos változásoknak köszönhetően, amelyek már viszonylag fiatal kortól kezdve megjelenhetnek [158]. Emellett meg akartuk vizsgálni a D₃-vitamin poli(ADP-ribóz) polimerázra gyakorolt gátló hatását összehasonlítva a kontroll és a DHT-kezelt állatokkal.

Eredményeink összhangban állnak korábbi hipertóniáról és cukorbetegségről szóló tanulmányok megfigyeléseivel [72, 155, 158, 159], miszerint a DHT kezelés fokozta a poli(ADP)-ribozilációt ovariumban és leukocitákban a PCOS-ben, hasonlóan a hipertóniában és cukorbetegségben leírt változásokhoz. További vizsgálatok szükségesek a PARP szerepének tisztázásához a PCOS-ben jelentkező hipertónia, cukorbetegség és kardiovaszkuláris károsodás kialakulásában, - vizsgálatunk lehet az első lépés ebben az irányban.

Összefoglalásként, a poli(ADP-ribóz) polimeráz aktivációja kimutatható számos különböző patológiás állapotban (krónikus gyulladás, autoimmun betegségek, pl.: arthritis, colitis), vaszkuláris kórképekben (atherosclerotikus plakkok, diabéteszes betegek mikroereiben), iszkémiás állapotokban (myocardiális infarktus, bypass műtét, stroke), valamint krónikus szívelégtelenségben [159], azonban PCOS-re vonatkozóan munkacsoportunkat megelőzően nem volt adat. Vizsgálataink során a PCOS-s patkányok leukocitáiban és az ovariumaiban észlelt emelkedett PARP aktiváció igazolta hipotézisünket, miszerint a PCOS hasonlóan viselkedik a többi kardiovaszkuláris kockázatfokozódással járó állapothoz – itt a D-vitamin kezelés mérsékelte, illetve kivédte a DHT hatását. Ugyanakkor a DHT-kezelés feltehetően direkt PARP gátló hatásként szignifikánsan csökkentette a PARP aktivitást az aorta endotheliális és simaizom rétegeiben egyaránt és a D₃-vitamin kezelés ezen nem változtatott. Eredményeink alapján felmerül annak lehetősége, hogy az eltérő androgén metabolitok illetve az eltérő szervek különböző PARP választ adnak – ennek az individuális reakciónak a háttere még nem ismert.

5.2.8. Nitratív stressz PCOS modellben aortán

A mérsékelt fokú krónikus gyulladás és a következményes leukocitosis gyakori PCOS-ben [160, 161]. Következésként vagy okként, az inzulin rezisztencia szintén a PCOS jellegzetes tünete. Emellett csökken az ovarialis NO és prosztaglandin E₂ (PGE₂) termelés [162], valamint endothel diszfunkció alakul ki [125, 163]. Eredményeink szerint az arterioláris NO metabolizmus és a NO-mediálta vazorelaxáció jelentősen károsodott PCOS patkány modellben [108, 164, 165]. Hasonlóan a rezisztencia erekhez, ahol a D₃-vitaminnak nem sikerült javítania az acetil-kolin relaxáción, PCOS modellünkben a thoracalis aorta acetil-kolin indukált relaxációs képessége is károsodott.

A gyulladás fokozott oxidatív-nitratív stresszhez vezet. A szisztémás nitratív stressz vizsgálatához munkacsoportunk keringő leukocitákban mérte a tirozin nitráció mértékét. Mivel a limfocitáknak hosszú a féléletideje, a polimorfonukleáris sejtekhez és a makrofágokhoz képest erősebb védekező mechanizmusokkal rendelkeznek az oxidatív-nitratív stresszel szemben. A keringő mononukleáris sejtekben erősebb a nitrotirozin festődés mindkét DHT csoportban, tehát eredményeink alapján krónikus gyulladás valószínűsíthető.

Emellett patkány ovarium és aorta szövetekben (az endothel és simaizom rétegben egyaránt) szintén erősebb tirozin nitrálást tapasztaltunk. Hasonlóan vizsgálatunkhoz, Abdollahi kutatócsoportja publikálta, hogy a lipid peroxidáció és a peroxinitrit szintek megemelkednek 21-napos hiperandrogén állapotot követően. Emellett a gyulladásos citokinek termelése is fokozódott PCOS patkány modelljükben [166, 167]. Abdollahi és munkacsoportunk megfigyelései szerint is az oxidatív-nitratív stressz és a gyulladásos válaszok fontos szerepet játszanak a PCOS patogenezisében.

A reproduktív rendszerben az ösztrogén bioszintézis fontos stimulátora a D₃-vitamin [168]. A hiperandrogén környezet, alacsony D₃-vitamin szinttel kombinálva kifejezett ovarium alulműködéshez vezet. A D₃-vitamin-pótlás modellünkben befolyásolta az ovarium morfológiát [108, 169] és az inzulin szekréciót, valamint fokozta az inzulin-receptor expressziót [170-173]. Míg Ardabili és mtsai munkája alapján 3 hónapos D₃-vitamin-pótlás nem javított az inzulin rezisztencián (csak az inzulin szekréción) PCOS-ben, addig modellünkben az inzulin szenzitivitás normalizálódott [108]. A legfőbb különbség a két vizsgálat között a D₃-vitamin-pótlás kezdetében (fiatal felnőtt nők vs. ivarérett patkányok) és a dózisában volt. Vizsgálatukban a D₃-vitamin célérték 20 ng/mL fölött volt (átlag: 23,4 ng/mL), így a súlyos D-vitamin hiány helyett a mérsékelt D-vitamin elégtelenség állapotát

vizsgálták, míg munkacsoportunk magasabb értékre pótolta a D-vitaminszintet. Hyppönen, illetve Pittas a D-vitamin bevitel protektív hatásáról számolt be az 1-es és 2-es típusú cukorbetegségek kifejlődésének megelőzésében [174, 175]. A D₃-vitamin csökkenti az LDL szintet és a kardiovaszkuláris rizikót PCOS-s nőkben [176]. Emellett gyulladáscsökkentő [177-179], valamint kardiovaszkuláris védő hatását [180] is leírták. Egy korábbi tanulmány szerint a D₃-vitamin képes aktiválni az ösztrogén szintézist és a makrofágokban található proinflammatorikus citokinek termelődésének csökkentése révén fokozza az aromataz expressziót [181]. Vizsgálataink alapján a D₃-vitamin kezelés mérsékelten javította az endothel funkciót. Azonban a D₃-vitamin e hatása részleges volt, mivel az acetil-kolin indukált relaxáció a kontroll szint alatt maradt. Tekintettel a D₃-vitamin szerteágazó hatásaira, további vizsgálatok indokoltak egyéb érintett mechanizmusok és útvonalak tisztázása érdekében.

Walch és mtsai humán vizsgálatban kimutatták, hogy az eNOS genotípus valószínűleg független a PCOS-től [182]. Az eNOS szint szignifikánsan alacsonyabb volt a DHT csoportban, ami magyarázza, hogy miért volt a NO-függő relaxációs képesség a kontroll csoport szintje alatt. Emellett a tesztoszteron szuprafiziológiás dózisban alkalmazva gátolja az eNOS expressziót de egyben fokozza a NO termelést [183]. Ebből következtethetünk arra, hogy az emelkedett peroxinitrit szint forrása valószínűleg a NOS indukálható, nem endotheliális izoformája [162, 184, 185]. Emellett a csökkent eNOS expresszió fokozza az iszkémiás-reperfúziós károsodás rizikóját. Valószínűleg kompenzációs mechanizmusként, a COX₂ festés kétszer erősebbnek bizonyult a DHT-kezelt patkányokban a kontrollhoz viszonyítva. Munkacsoportunk elsőként írta le hiperandrogén állapotban az eNOS és COX₂ receptor expresszió reverzibilis változását az aorta endotheliumban. A D₃-vitamin kezelés eredményeként az eNOS expresszió szignifikánsan nagyobb volt, mint a DHT csoportban és visszatért a kontroll szintjére. Az a tény, hogy a közel normális eNOS transzláció nem hozta a kontroll szintjére a relaxációt, valamint sem a szisztémás, sem a lokális aorta nitrotirozin szint nem csökkent D₃-vitamin-pótlás hatására, arra enged következtetni, hogy egy mérsékelt gyulladás még a D₃-vitamin kezelés alatt is fennállhat. A D₃-vitamin kezelt csoportban a COX₂ expresszió emelkedett maradt a kontrollhoz képest, valószínűleg az NO csökkent biológiai hozzáférhetőségének kompenzálása érdekében. Feltételezzük, hogy az ok az eNOS elérhetőségének csökkenése és a következmény a COX₂ transzláció növekedése. Molekuláris szinten, a D₃-vitamin kezelés fokozza az eNOS expressziót [186], amely fokozott relaxációs

képességhez vezethet, ha gyulladásos folyamat nem növeli egyidejűleg a nitro tirozin képződést.

Konklúzió

Munkacsoportunk számolt be elsőként PCOS modellben az eNOS és COX₂ szint változásáról aorta endotheliumban. Ez részben magyarázhatja a vérnyomás kontroll mechanizmusok megváltozását PCOS-ben.

Eredményeink emellett igazolják az adjuváns D₃-vitamin kezelés előnyös hatásait PCOS modellben; az ovarium és a szénhidrát metabolizmus szintjén majdnem teljesen visszafordítható, DHT által okozott károsodásokat tapasztaltunk. A D₃-vitamin képes az ösztrogén szintézis serkentésére is. A D₃-vitamin-pótlás hatása a vaszkuláris és a szisztémás nitratív stresszre nem teljesen tisztázott, de molekuláris szinten a D₃-kezelés fokozta az eNOS expressziót, ami fokozott relaxációs képességhez vezethet.

5.2.9. Véna saphena adaptáció PCOS modellben

A nőstény patkányok DHT kezelése szignifikáns változásokat indukált a saphena vénák geometriájában, elaszticitásában és reaktivitásában. A relaxált lumen kitágult és ezt a faltömeg növekedése kísérte („hipertrófiás remodelling”). A falfeszülés nem változott az érfal vastagság növekedése miatt, de az izobárikus diszténzibilitás növekedett. Az elasztikus modulus sem változott, ami azt mutatja, hogy a remodelling a passzív mechanikai tulajdonságokért felelős kötőszöveti alkotók jelentősebb változásai nélkül zajlott. Korábbi *ex vivo* kísérletekben a nyíró erő és a vénás vérnyomás növekedése nagyobb érátmérőt és a vénafal remodellingjét eredményezett [187, 188]. A DHT androgén-receptor-függő és -független úton egyaránt növelte a simaizomsejt-proliferációt [189]. Hasonló, áramlás-függő változásokat tapasztaltak visszártágulat esetén [190]. A szexuáliszteroidok és a visszártágulat kapcsolatát korábban már humán vizsgálatok értékelték [191, 192], azonban a PCOS nőkre vonatkozó adatunk jelenleg sincs. A PCOS-ban és DHT kezeléssel alapuló modellünkben is megfigyelhető testsúlynövekedés (elhízás) és a következményes véráramlás fokozódás állhat a modellünkben detektált vénás átmérő növekedés és faltömeg szaporulat mögött [193]. E változások egyúttal nagyobb falfeszülést is okoznak. A vénás rendszerre vonatkozó vonatkozó vizsgálatok hiányában eredményeinket csak artériákra vonatkozó érbiomechanikai adatokkal tudjuk összevetni. PCOS-ban az artériák elaszticitása csökken, faluk rugalmatlanabbá válik; a carotis communis artéria merevsége és intima-media vastagsága nő, diszténzibilitása csökken [25, 110, 111].

Kísérletünk igazolja, hogy kis dózisú D₃-vitamin-kezelés képes módosítani a vénafal DHT kezelésre kialakuló morfológiai remodellingjét és ellensúlyozni a hiperandrogén állapot okozta vénás érfalmerevség és falfeszülés fokozódást. Korábban leírták, hogy a D₃-vitamin szuprafiziológiás koncentrációban csökkenteti SMC-kultúrában a tropoelasztin expressziót [194, 195], Tukaj és Wrzolkowa [196] szerint az alacsony-dózisú kalcitriol aortában fokozza a vaszkuláris SMC-proliferációt.

Véna saphenán DHT-kezelt állatokban a noradrenalin kontraktilitás csökkent, míg a szegmensek myogén tónusa alacsonyabb, fiziológiás nyomásokon nőtt. Az ACh-indukált endotheliális dilatáció mértéke nem csökkent, és az L-NAME hatására kialakuló NO-blokád markánsabb volt a DHT-kezelt szegmenseken, ugyanakkor az eNOS-expresszióban nem találtunk szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest. Megfigyeléseink azzal magyarázhatóak, ha feltételezzük, hogy a DHT-kezelt csoport tónusát egyéb – kísérletünkben nem tesztelt - vazokonstriktor hatás fokozódás is befolyásolhatta. A visszerekben a krónikus vénás pangás következtében szignifikánsan csökkent eNOS és nNOS expressziót írtak le, amely felveti annak lehetőségét, hogy a patológiás dilatációban egyéb, NO-független mechanizmus is részt vehet [197]. A csökkent biológiai hozzáférhetőségben lehetséges, hogy szerepet játszik a mesenterialis venulákon Brookes [198] által megfigyelt jelenség, miszerint az emelkedett vaszkuláris oxidatív stressz limitálta a NO hatását. A PCOS-ben már megfigyelt inzulin-rezisztencia [108, 199] szintén hathat a NO-útvonalra [200]. A caveolin-1 scaffolding doménje csökkenti az iNOS és az eNOS függő NO-kiáramlást is mezenterialis venulákban, - hasonló gyulladásgátló mechanizmus modellünkben is kialakulhatott [201].

A vaszkuláris tónus kontroll szabályozásában az endogén prosztanoidok szerepe fontos. Racz és mtsai [202] szerint a COX₂-TXA₂-út kulcsfontosságú a vénás vazokonstriktációban. Ezzel összhangban PCOS-ben artériákon megnövekedett vazokonstriktor prosztanoid aktivitást észleltek [125]. Vizsgálatunkban a DHT-kezelt csoport vénás endotheliumában mért csökkent COX₂-expressziót változatlan endotheliális vazodilatáció kísérte. A DHT androgén-receptor-függő módon fokozza a COX₂-expressziót fiziológiás körülmények között, ugyanakor androgen receptor-független módon csökkenti gyulladásban, humán coronaria vaszkuláris SMC-kultúrában [203]. További vizsgálatok szükségesek a vénák kiegészítő adaptációs mechanizmusai, például esetleges COX₁ expresszió változás illetve NOS-izoformák közötti arány-eltolódás meghatározására [100].

A D₃-vitamin kezelés nem befolyásolta a DHT kezelés hatására kialakult teljes vaszkuláris adaptációs tartomány (a maximális kontrakció és relaxáció közti különbség) csökkenést,

azonban fokozta a NA-reaktivitást és fiziológias nyomásokon csökkentette a myogén tónust, vagyis az eredmények hasonlóak az arteriolákban megfigyeltekhez [165]. A D₃-vitamin-kezelés vénákon is mérsékelten nagyobb mérvű relaxációt és javuló vaszkuláris adaptációt okozott. Az L-NAME-indukált tónus és az endotheliális COX₂-expresszió csökkenést visszafordította. Humán v. umbilicalis endothel sejtkultúrán (HUVEC) 1 nM D₃-vitamin koncentráció alkalmazása mellett D-vitamin-receptor közvetítéssel az NO-termelés és az eNOS-aktivitás fokozódását detektálták [204]. Vizsgálatunkban a NO-függő vazodilatáció gátlása a DHT+D₃ csoportban hasonló tónusokat eredményezett, mint a kontroll csoportban, visszafordítva ezzel a DHT kezelés hatását. Feltételezhető, hogy a bazális vénás tónus a bazális NO-kiáramlástól függ, amelyet a DHT kezelés csökkent és a D₃-vitamin-kezelés fokoz. Eredményeink szerint a bazális NO-kiáramlás változását nem az eNOS megváltozott expressziója váltotta ki. Ez a tény magyarázhatja a három csoport hasonló ACh-dilatációját. A D₃-vitamin vénákban a már említett alternatív értágító mechanizmusokat serkenti (mint artériás oldalon a prosztanoid út), amely így kiegészítheti a NO-relaxáció hatását. Vizsgálatunk korlátjaként említendő, hogy a kísérlet hossza nem tette lehetővé, hogy kiterjesszük megfigyeléseinket a NO mellett, a prosztanoid és egyéb útvonalak tesztelésére, így további vizsgálatok szükségesek a PCOS vénás hatásainak tisztázására.

Konklúzió

PCOS állatmodellben elsőként foglalkoztunk a vénák biomechanikájával és farmakológiai reaktivitásával. A hiperandrogén állapot vastagabb, rugalmatlanabb vénafalat eredményezett, amely visszérbetegségben is megfigyelhető, azaz vénafal remodellinget észleltünk, amely értelmezhető a visszérkárosodás korai jeleként. A vénák változásai kissé különböztek a rezisztencia arteriolákban korábban megfigyeltektől. A krónikus DHT-kezelés okozta visszér változásokat az egyidejű D₃-vitamin kezelés nagyrészt megelőzte.

5.2.10. Második PCOS modellünk eredményeinek megbeszélése

Újabb kísérleteinkben a hiperandrogén állapot és a D-vitaminhiány kombinált patkány modelljét alakítottuk ki, mivel ismert, hogy PCOS-ben sok esetben gyakori és súlyos fokú a D-vitaminhiány, tehát ez a klinikai gyakorlatban előforduló gyakori komorbiditás. Mindkét állapot a kardiovaszkuláris betegségek és a cukorbetegség rizikófaktorai [118, 205-209]. Néhány klinikai vizsgálat felvetette, hogy nőkben jelentkező androgén többlet esetében az alacsonyabb D-vitamin szint fokozza az inzulin rezisztencia és coronaria betegségek rizikóját.

Ebben a kísérletünkben a két károsító tényező önálló, illetve együttes hatását kívántuk tesztelni a metabolikus paraméterekre, illetve a coronaria arteriolák funkciójára.

Eredményeink validálták a modellt: mind a D-vitaminhiány, mind a hiperandrogén állapot konzekvensen kialakult. Legfontosabb megfigyelésünk, hogy mindkét kezelés inzulin-rezisztenciát okozott, de eltérő mechanizmussal. Korábbi modellünkben is leírtuk, hogy az inzulin-rezisztencia a hiperandrogén státusz egyik következménye [210-212]. Ugyanakkor a D-vitaminhiány, illetve a két károsító tényező kölcsönhatását korábban nem vizsgálták. A tesztoszteron-kezelés emelkedett vércukorszintet eredményezett és nem volt hatással a plazma inzulin szintre (a tesztoszteron-kezelésben nem részesült kontrollokkal összehasonlítva), a D-vitaminhiány viszont változatlan glükóz szintet és fokozott inzulin szekréciót okozott (a D-vitamin-pótolat állatokkal összehasonlítva). Mindkét változás az inzulin rezisztencia speciális formája. Az első esetben, az OGTT során a változatlan inzulin szint nem tudta megelőzni a hiperglikémia kifejlődését, míg a második esetben magasabb inzulin szint volt képes a vércukorszintet normalizálni. Az első esetben csökkent béta-sejt szenzitivitás feltételezhető (az emelkedett glükóz nem indukált magasabb inzulin választ), míg a második esetben szisztémás inzulin rezisztencia feltételezhető, mert a vércukorszint rendezéséhez magasabb inzulinszint szükséges. A két károsító tényező együttes alkalmazása esetén a károsodás additív volt; azaz a D-vitaminhiányos, tesztoszteron-kezelt állatok magasabb 120-perces inzulinszintje sem tudta normalizálni a plazma glükózt, így a kombinált noxa várhatóan hamarabb eredményez kettes típusú cukoretegséget, mint bármelyik károsító hatás önmagában.

Hasonló módon, mindkét tesztoszteron kezelt és a nem tesztoszteron kezelt D-vitaminhiányos csoportban is emelkedő tendenciájú szérum leptin szintet mértünk, melyet általában leptin rezisztencia is kísér, amely szintén jellemző metabolikus rizikófaktor [213]. A D-vitamin receptor nagyobb expressziója zsírszövetben emelheti a szérum leptin szintet [214].

Az inzulin artériákon dominánsan eNOS-mediált vazodilatációt eredményez, amelyet számos egyéb hormon befolyásol [215]. 8-hetes protokollunk végén, a D-vitaminhiányos és a tesztoszteron-kezelt nőstény patkányokból preparált coronaria arteriolák inzulin-indukálta relaxációja csökkent. Ez kifejezettebb volt kombinált noxa, illetve magasabb inzulin koncentrációk esetében. E hatások kiváltó mechanizmusaiként a következőket feltételezhetjük: a tesztoszteron kezelés önmagában csökkent inzulin relaxációt eredményezett az érfali inzulin-receptorszám vagy a posztprandialis inzulin szint befolyásolása nélkül, - így ebben egy specifikus, vaszkuláris inzulin-receptor útvonal lehet érintett. A D-vitaminhiány

önmagában szintén csökkentette az inzulin relaxációt, azonban lényegesen növelte az érfal inzulin-receptor számot. Valószínűsíthető a csökkent inzulin-receptor szenzitivitás az érfalban, amelyet az emelkedett receptor szám sem tudott kompenzálni. Feltételezhető az inzulin-receptor funkcionális zavara is, mivel az OGTT 120' plazma inzulin szint emelkedett, amely ugyanakkor a glükóz szintet egyensúlyban tartotta. Klinikai szempontból érdekes látni e két károsító tényező kölcsönhatását. Kísérletünkben a kezdődő metabolikus szindróma fontosabb tényezői vizsgálhatók voltak: megnövekedett testsúly, magas 120' terheléses glükóz szint amely nem csökkent a kissé emelkedett terheléses (120') inzulin szint hatására, szisztémás és vaszkuláris inzulin-rezisztencia (emelkedett HOMA-IR). Az inzulin-érzékenység funkcionális zavarát a magasabb inzulin-receptor expresszió sem tudta kompenzálni. Az előző PCOS modellünkhöz képest tapasztalt különbséget, miszerint a D-vitaminpótolts tesztoszteronos csoportban is csökkent inzulin relaxációt találtunk, magyarázhatja, hogy a coronariák és a gracilis arteriolák hasonló méretű, de eltérő szöveti környezetből származó erek, így farmakológiai reaktivitásuk mutathat regionális különbségeket – megállapíthatjuk, hogy ebben a vonatkozásban a coronariák inkább az aorta reaktivitásához hasonló reakciót mutattak. Másik lehetőség, hogy a tesztoszteron markánsabb károsodásokat okoz a DHT-hoz képest; ennek hátterében – előzetes, jelenleg még nem publikált adataink alapján - az általunk vizsgált mechanizmusok között állhat az is, hogy a DHT ismert PARP gátló metabolit (e tulajdonsága mérsékelheti a káros metabolikus hatásokat), míg a tesztoszteron nem rendelkezik ilyen tulajdonsággal.

Újabb eredményeink szerint koszorúszereken a fentiek mellett a miogén tónus csökkenése is észlelhető mindkét noxa jelenlétében, míg a D-vitaminhiány ezen túlmenően csökkentette az adanozin függő relaxációt is [216]. A D-vitaminhiány prehipertenzív elváltozásként mind koszorúszereken, mint agyi ereken növelte a falvastagságot, csökkentette a tangenciális tresszt és a miogén tónust. Agyi ereken vizsgáltuk a tesztoszteron függő relaxációt is, melyet a D-vitaminhiány mind hím, mind nőstény állatokban csökkentett, illetve hiperandrogén nőstényekben is ugyanezt tapasztaltuk a kontroll nőstényekhez és hímekhez viszonyítva, ahol markáns vazorelaxációt detektáltunk [217]. Az agyi ereken D-vitaminhiány hatására az elváltozás markánsabb volt; mind hímekben, mind nőstényekben falvastagodást, lumenredukciót és eutróf remodellinget tapasztaltunk, melyek ismert hipertóniás – prehipertenzív elváltozások [91, 217, 218]. Korai károsodásokat detektáló modellünk felhívja a figyelmet arra, hogy mind a hiperandrogén állapot, mind a D-vitaminhiány önmagában is, de együtt különösen markáns vaszkuláris károsodásokat indukálnak az érrendszer számos

pontján. A klinikum számára e vizsgálatok üzenete az, hogy a cikluszavaron túl hasonló anyagcsere konstellációjú betegekben a kardiometabolikus szövődmények megelőzésére kiemelten kell ügyelnünk.

Konklúzió

A nőkben jelentkező, D-vitaminhiánnyal társult hiperandrogén státusz (mely gyakori klinikai szituáció), mint kombinált patogén faktorok metabolikus és vaszkuláris hatásait vizsgáltuk policisztás ovarium szindróma (PCOS) állatmodellben. Ivarérett nőtény patkányok transzdermális tesztoszteron-kezelésben részesültek, és a társuló D-vitaminhiány jelenléte vagy hiánya megmutatta, hogy mindkét állapot – különböző mechanizmussal – a metabolikus-szindróma tüneteit és a coronaria arteriolafal inzulin érzékenységének csökkenését eredményezte. A tesztoszteron emelkedett terheléses vércukorszintet okozott hyperinzulinémia nélkül, valamint a szérum leptinszint emelkedését. Az inzulinra adott vaszkuláris válasz csökkent a változatlan inzulin-receptor expresszió ellenére. A D-vitaminhiány növelte a terheléses inzulin szintet, és csökkent inzulinra adott érválaszt eredményezett az érfal mindkét rétegében mért vaszkuláris inzulin-receptor szám emelkedés ellenére. Azaz két, eltérő úton kialakult vaszkuláris inzulin rezisztencia létezik, együttes jelenlétük egymást rontja, gyorsítva a károsodás öngerjesztő körét és növelve a kettes típusú cukorbetegség kialakulásának valószínűségét. Megfigyeléseink alapján a D-vitaminhiányt kiemelt gondossággal érdemes kerülni női hiperandrogén állapotban, hogy csökkentsük a metabolikus-szindróma és a vaszkuláris károsodások kialakulásának esélyét.

5.3. Érhatások menopauza modellekben normo- és hipertóniában

5.3.1. Intramuralis coronaria arteriola változásai hormonhiányban és hormonpótlás mellett

Néhány hormonpótló kezeléssel szülő randomizált-kontrollált vizsgálat kiábrándító volt a kombinált hormonpótlás vaszkuláris, kifejezetten a coronaria erekre vonatkozó protektív hatásainak tekintetében [219, 220]. Emellett az a tény, hogy mindkét tanulmányban a hormonpótlás a menopauzát követően évekkel később kezdődött, részben magyarázatot adhat a hormonpótló kezelés véralvadási rendszert érintő kedvezőtlen hatásaira [221, 222]. Ennek ellenére mind állatkísérletes, mind humán vizsgálatok alapján ismert az ösztrogén előnyös hatása az érrendszer biomechanikai tulajdonságaira [57, 223, 224]. Korábbi eredményeink szerint a menopauzával egyidejűleg kezdett ösztrogén pótlás rágszáló modellben kivédte a hormonhiány okozta autoregulációs és CO₂ érzékenységben bekövetkező változásokat az agyi keringésben [225, 226], humán vizsgálatokban pedig igazoltuk a menopauzában egyes, ateroszklerózis irányába mutató gyulladásos mediátor mechanizmusok aktiválódását, melyekre az általunk vizsgált különböző hormonpótló sémák kedvezően hatottak [95, 227-231]. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy a hormonpótló kezelések egyes hatóanyagai között lehetnek különbségek a kardiovaszkuláris kockázat módosító hatás vonatkozásában.

Az ösztrogén és a kombinált hormonpótló kezelés is kedvező hatású a kis perifériás artériák biomechanikai jellemzőire [57, 62]. A hormonpótló kezelésekről szülő in vitro érvizsgálatok többségét aortán és carotis artéria szegmenseken végezték, a kiemelten fontos coronaria artériákat csak Zhang és munkatársai vizsgálták, ők viszont epicardialis ereket teszteltek [76]. Intramuralis coronaria artéria szegmenseket a preparáció nehézségei miatt munkacsoportunk előtt nem vizsgáltak a hormonpótlásra vonatkozóan sem [63, 64, 81].

Eredményeink alapján az ovariectomia következtében csökkent az intramuralis coronaria szegmensek külső sugara és falvastagsága, hasonlóan a kis perifériás artériákon végzett vizsgálataink eredményeihez [57], ugyanakkor különbözik Zhang és munkatársai által a subepicardialis coronariakon találtaktól [76]– utóbbi ismételt felhívja a figyelmet arra, hogy az epicardialis coronariakon nyert adatok nem jelzik előre az intramuralis ágak viselkedését. Eredményeink szerint a női nemi hormonok hiánya következtében kialakult csökkent érsugarat és falvastagságot emelkedett falfeszülés és spontán értónus kísérte. Az ösztrogén pótlás megelőzte az érfal geometriai változásait, az értónus azonos volt a kontroll csoporttal és a mechanikai stressz is csökkent. Az ösztrogén-kezelt állatokban a coronaria szegmensek

sokkal rugalmasabbak voltak a fiziológiás nyomástartományban (50 Hgmm fölött). Ez a vaszkuláris konduktancia funkcióban bekövetkezett változásokat mutatja: magasabb nyomáson a rugalmasabb artériák kisebb mechanikai stresszel képesek jobb és szabályozhatóbb szöveti perfúziót biztosítani. Ez kiemelten fontos az intramuralis coronariákon, ahol a véráramlás intermittáló.

Az ovariectómia fokozott TXA₂-kontrakciót és csökkent bradykinin-relaxációt eredményezett. Az ösztrogén-kezelt csoportban a kontrollal megegyező kontrakciós választ és nagyobb bradykinin-indukált relaxációt láttunk.

A kontroll csoportban a maximális kontrakció és relaxáció közötti különbség mértéke körülbelül 20% volt. Ez azt jelenti, hogy az intramuralis coronaria szegmenseknek körülbelül 10% mozgása van mindkét irányban, hogy válaszoljon bármely stimulusra. A kontrollokhoz viszonyítva, az ovariectómia szignifikánsan növelte a maximális (TXA₂-indukált) kontrakciót és csökkentette az endothelium-dependens (bradykinin-indukált) relaxációt. Lamping epicardialis coronaria szegmenseken hasonló érválaszt talált. Adataik részlegesen vethetők össze krónikus kezelésünkkel, amelyben az állatokat 4 héten keresztül kezeltük ösztradiollal, míg Lamping a 17- β -ösztradiol akut vaszkuláris hatásait vizsgálta, illetve különböztek az ér-ágak, a mechanikai terhelés és a szöveti környezet is [83].

Eredményeink alapján az ösztrogénpótlás a hormonhiánnyal ellentétes irányú változásokat okozott: a TXA₂-indukálta kontrakció visszatért a kontroll szintjére, azaz csökkent. Az endothelium (bradykinin)-függő dilatáció is visszatért a kontrollhoz, sőt, nagyobb nyomásokon még nagyobb relaxációt tapasztaltunk. Az utóbbi valószínűleg magyarázható az általunk alkalmazott folyamatos (és nem ciklikus) ösztrogén pótlással illetve a progeszteron pótlás hiányával [57]. A bradykinin szignifikáns vazodilatációt indukált minden csoportban, amely igazolja a funkcionálisan ép, intakt endothelium jelenlétét.

Összegzésképpen; az ösztrogén-pótló kezelés védelmet nyújtott a női nemi hormonhiánnyal kapcsolatos, kedvezőtlen biomechanikai, spontán értónusbeli és farmakológiai regulációt érintő változások ellen a szív vérrellátásáért közvetlenül felelős intramurális kis koszorúsereken. Elsőként írtuk le a hormonpótló kezelés hatásait az intramuralis coronariákra.

5.3.2. Akut ösztradiol hatás vizsgálata krónikus hormonhiányban arteria saphenán

Eredményeink alapján a hosszú-távú ösztradiol pótló kezelést követően az ösztradiol perifériás kis artériára kifejtett direkt, nem-genomiális vazorelaxáns hatása csökkent. 14-napos ösztradiol kezelés szisztémás vazodilatációt és alacsonyabb vérnyomás értéket eredményezett [232]. Kémiai ovariectómián átesett nőstény patkányokban a krónikus ösztrogén pótlás morfológiai dilatációt okozott és növelte a kis artériák noradrenalin-indukálta kontraktilis választartományát [57]. Ösztrogén akut adása posztmenopauzában lévő nőkben fokozta a coronaria és alkari artériákban az ACh-indukált vazodilatációt [233, 234]. *In vivo* állatkísérletes modellek a 17- β -ösztadiol akut, endothelium-független vazodilatációs hatását is felvetik [235]. *In vitro* kísérletek azt bizonyítják, hogy az ösztadiol – szuprafiziológias dózisban – direkt, nem-genomiális, specifikus relaxáló hatással rendelkezik prekontrahált coronaria artéria gyűrűkén [236] és prekontrahált perifériás kis artéria szegmenseken [68]. Az ösztadiol genomiális hatásai esetében a kiváltott hormonhatás „down” vagy „up” regulációja gyakori jelenség. Az általunk megfigyelt hatás hátterében állhatna a citoplazmatikus ER protein csökkent expressziója [237], azonban munkacsoportunk korábbi vizsgálatai azt bizonyítják, hogy e kisartéria ösztadiol által indukált akut, *in vitro* vazodilatációja nem a citoplazmatikus ER-on keresztül valósul meg, mivel specifikus blokkolószert, a clomiphene alkalmazása esetén a hatás nem változott [68].

Egy klinikai tanulmányban az ösztadiol keringésre kifejtett krónikus és akut hatásainak interakcióit tapasztalták: krónikus alkalmazása csökkentette az ösztadiol akut coronaria dilatációs hatását posztmenopauzában lévő nőkben [238], hasonlóan a mi, muskulokután arteriolán nyert eredményeinkhez. Ugyanakkor, az akut ösztadiol hatására létrejövő endothelium-függő vazodilatáció nem csökkent a hosszú-távú ösztrogén-pótló kezelés (ERT) esetén [233, 239, 240]. Az ERT akut, ösztadiol-indukált vazorelaxációt okozó hatásairól szóló ellentmondásos adatok a hatóanyag, a hosszú-távú ösztrogén terápia, az érterület különbségeiből is adódhatnak. Eredményeink voltak az első közvetlen adatok a kis rezisztencia artériára vonatkozóan. Az izolált artéria eredmények könnyebben értelmezhetőek; a szisztémás befolyásoló hatásoktól elkülönítve tanulmányozható az adott ér; így eredményeink igazolják, hogy a rezisztencia erek érzékenysége valóban a hormonstátusztól függően változik.

Eredményeink szerint az ösztadiol akut (nem-genomiális) hatása clomiphene-érzékeny, illetve nem is Ca-csatorna mediált, de a krónikus ösztadiol előkezelés hatására mérséklődik. Az ovariectomizált patkányokból származó saphena artéria szegmensek akut ösztadiol-indukálta vazodilatációja hasonló volt, mint korábban vizsgált, intakt ovariummal rendelkező nőstény patkányok esetében [68].

Ennek alapján felmerült a lehetősége, hogy az ösztrogén-kezelt patkányokban általánosan csökkent a relaxációs válasz. E kérdés tesztelésére vizsgáltuk az akut nifedipin relaxációt, ahol a két dózis-hatás görbe azonos volt. Érdekes megjegyezni, hogy kísérletünkben a 17- β -ösztadiol értágító hatékonysága *in vitro* összehasonlítható volt egyéb ismert vazorelaxánsokkal.

Néhány korábbi vizsgálat szerint az akut *in vitro* ösztadiol kezelés Ca^{2+} -antagonista hatású [241, 242]. Kevésbé valószínű annak a lehetősége, hogy a krónikus ösztadiol kezelés közvetlenül változtatná a Ca^{2+} -csatorna fehérjék expresszióját, mivel a nifedipin relaxáció nem volt érintett. Nőstény patkányokban az az ösztadiol koncentráció, amely akut, *in vitro* vazorelaxációs hatást vált ki, 4-5 nagyságrenddel magasabb, mint a normál szabad ösztrogén plazma koncentráció. Az akut ösztadiol vazorelaxáció lehetséges fiziológiai jelentősége még kérdéses. Ugyanakkor néhány klinikai vizsgálat szerint a szuprafiziológias dózisú ösztadiol alkalmazása előnyös hatású myocardialis iszkémiában. Ezt a klinikailag fontos hatást okozhatja a közvetlen coronaria relaxáló hatás vagy a perifériás vazodilatáció is [243-245].

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy krónikus hormonpótló kezelésben részesülő betegekben az ösztadiol akut érhatása csökkenhet. Ennek hátterében többféle mechanizmus is állhat. Teszteltük a sejtdhéziós molekulák közül a connexin-43 (Cx43) hormonfüggő expresszióját, mint kísérleteinket megelőzően feltételezett lehetséges mechanizmust [246, 247]. Ovariectomizált, de egyébként intakt, nem-hipertóniás állatokban az aorta simaizom sejtek gap junction kapcsolatai nem változtak [248]. A szexuáliszteroidok egyéb patológias állapotok nélküli krónikus hiánya nem módosítja a Cx43 bioszintézisét. Ezen állatmodellben a hormonális státusz és a Cx43 expresszió között nem mutatkozott kapcsolat, mivel a szexuáliszteroidok nem befolyásolták az aorta simaizomsejtek gap junction kapcsolatait [248].

Érfiziológiai kísérletünk igazolta, hogy az ösztadiol perifériás kiartériákon kifejtett, akut vazodilatációs hatása csökken a krónikus ösztadiol előkezelés hatására ovariectomizált állatokban. Ez a megfigyelés a krónikus ösztadiol pótlás közvetlen hatásának létét igazolja perifériás kisartériákon. Egyidejűleg azt mutatja, hogy a női nemi hormonok genomikus és

nem-genomikus hatásai között léteznie kell kölcsönhatásnak. Ezt már korábban igazolták a coronaria véráramlásra kifejtett hatásával kapcsolatban [238], mely perifériás kis artériák esetében szintén fennáll, és összefügghet a hosszú-távú hormonpótlás kiváltotta, érszövetben kialakuló morfológiai változásokkal is [57, 249].

5.3.3. A vénás rendszer változásai menopauza modellben normotóniában

Tudjuk, hogy posztmenopauzában a nők elvesztik a férfiakhoz képest relatív kardiovaszkuláris védettségüket, melynek oka feltételezhetően a női nemi hormonok hiánya [250]. Az artériák biomechanikai tulajdonságainak (kontraktilitás, geometria, merevség) károsodását jelentősen befolyásolja a női hormonstátusz [57, 224, 251] ugyanakkor a hormonpótlás vénás rendszerre kifejtett hatásait csak a tromboembóliás szövődmények szempontjából vizsgálták munkacsoportunkat megelőzően [252].

Bár kevés információ rendelkezésre állt a női nemi hormonok és a vénás biomechanika kapcsolatáról eltérő hormonális viszonyok között [190, 191], ezek a menopauza-hormonpótlás kérdéskörét nem érintették. Korábbi vizsgálatainkban kémiai ovariectómiát követően kisebb disztenziibilitást, merevebb vénafalat találtunk [60]. Ez a károsodás a vénák kontrahált, illetve relaxált állapotától függött – ennek alapján a kontraktilításban bekövetkezett változás feltételezhető volt; ennek igazolását tűztük ki célul.

Hasonlóan a korábbi, saphena artériákon mértékhez [57], a vénás kontraktilításban is szignifikáns hormonfüggő változásokat igazoltunk [250, 253]. Az ovariectómia hatására csökkent a noradrenalin-indukálta tónus, amelyet a női nemi hormonpótlás részlegesen helyreállított. A vénás simaizom tónus in vivo szerepet játszik a vénás kapacitancia rövid-távú kontrolljában [190]. A zavart vénás kapacitancia funkció ismert korai változás hipertóniában [254], valamint a vénás varicositas kialakulásában [255].

A vena saphena myogén (spontán) tónusa nem változott ovariectómiát követően, ugyanakkor a hormonpótlás csökkentette. Ez az eredmény ellentétben áll azzal a megfigyeléssel, amelyet patkányok kis mesenterialis vénáin tapasztaltak [256], ahol emelkedett ösztrogén és progeszteron szint esetében - úgy mint metösztrosz és terhesség – emelkedett a spontán (in vitro bazális) tónus. Ez a különbség adódhat a mezenterialis és a muszkulokután régiók eltérő szabályozásából, illetve a terhességben / fiziológias ciklusban a menopauzáétól eltérő hormonszintekből és -hatásokból. Eredményeinkkel összhangban, ugyakkor, az alszáraikon csökkent vénás tónus áll fenn várandósság során [257]. A krónikus hatás ideje is fontos tényező. Négy napig tartó 17- β -ösztradiol előkezelés sem volt hatékony abban, hogy a vénás

adrenerg reaktivitásban mérhető változásokat indukáljon nyúl modellben [258] és humán vizsgálat során [259]. Hosszan tartó (12 hetes) kezelést követően, az általunk megfigyelt kontraktilitásbeli változások feltehetően a simaizomsejtekben végbemenő, fehérje szintézist érintő hatások következményei. A kontraktilis fehérjék, a membrán receptor molekulák, valamint a kontrakciós folyamatban részt vevő egyéb fehérjék is érintettek lehetnek [241].

A disztenziilitás hormonfüggése eltérő a vénák relaxált és kontrahált állapotában [60]. Ennek megfelelően valószínű, hogy az ovariectómián átesett állatokban talált [60] csökkent vénás disztenziilitást (azaz rugalmatlanabb vénafalat) a vénás kontraktilitás változása eredményezi és az ösztrogén kezelés vagy direkt a vénafalra, vagy indirekt módon a vénás hemodinamikára gyakorolt hatása okozza. Az érátmérőben bekövetkezett változás ezt a feltevést erősíti.

Ismert, hogy a terhesség során fennálló megnövekedett ösztrogén és progeszteron szint emelkedett vérvolument okoz [257, 260] – hasonló hatása a hormonpótló kezelésnek is lehet. Számíthatunk arra, hogy e volumen jelentős része a keringés vénás oldalán tartózkodik, ezáltal megnövekedett vénás kapacitanciát igényel [261, 262]. E változások jelezhetik az érfal szerkezet kontraktilis elemeinek átrendeződését. Korábban azt találtuk, hogy mind az ösztrogén, mind a progeszteron szignifikáns vazodilatátor hatással rendelkezik a kisereken [68] – ez az akut hatás hozzájárulhat a hormonpótló kezelés során tapasztalt kontraktilitás változáshoz, bár ez az alkalmazott gesztagén típusától is függ.

Összefoglalásképpen, munkacsoportunk volt az első, amely az ovariectómia és a női nemi hormonpótlás hatásait vizsgálta a vénás kontraktilitásra. A noradrenalin-indukálta tónus csökkent, amely kapcsolatban állhat a vénás kapacitancia funkció romló kontrolljával. A hormonpótlás helyreállította a noradrenalin-indukálta tónust. Tehát az ovariectómia és a női nemi hormonpótlás a vénás disztenziilitás [60] mellett hat a vénás kontraktilitásra is, így az ovariectómia/ hormonhiány a vénás oldali keringés kedvezőtlen változásait okozhatja, melyet a hormonpótlás részben ellensúlyoz.

5.3.4. A vénás rendszer változásai menopauza modellben, hipertóniában

Szisztematikus vizsgálataink következő lépése az angiotenzin hipertónia – hormonhiány és hormonpótlás vénás hatásainak vizsgálatára irányult. Mivel ismert, hogy a posztmenopauza, mint állapot sokkal fogékonyabbá tesz kardiovaszkuláris betegségek és hipertónia kialakulására, így menopauzát követően e kórképek sokkal gyakoribbak. Ezért végeztük kísérleteinket ovariectómián átesett állatokon, a valós szituációhoz igazodva, azaz a

menopauzában kezdődő hipertóniát és a hormonhiány kezdetén, illetve a hipertónia kialakulásával egyidejűleg indított hormonpótló kezelést kívántuk modellezni.

Menopauzát követően a magasvérnyomás sokkal gyakoribb nőkben, mint fertilis korban [263]. A renin-angiotenzin rendszer érfali és keringő részei egyaránt fontos szerepet játszanak a posztmenopauzában lévő nőkben megfigyelt hipertónia és vaszkuláris károsodások kialakulásában [264]. Magasvérnyomás létrehozásához krónikus szubpresszor dózisú ATII infúziós modellt alkalmaztunk [50]. Véleményünk szerint a spontán hipertóniás patkány (SHR) nem optimális a posztmenopauzában kialakuló hipertónia modellezéséhez, mert ezekben az állatokban a magasvérnyomás kifejlődik függetlenül az ovariectomia el- vagy el nem végzésétől, még fertilis korban [265, 266]. Nem hasonlít a humán posztmenopauzában kialakuló hipertóniához, amelyben az emelkedett vérnyomás az ovarium endokrin funkciójának csökkenését követően fejlődik ki. Újabb eredmények szerint a menopauzában jelentkező hipertónia kóroki háttere különbözhet a születési súly alapján is. Normál születési súly esetén a RAS változásai elsődlegesek, ugyanakkor IUGR, alacsony születési súly esetén androgén receptor függő mechanizmusok is részt vesznek a folyamatban [267].

Vizsgálatainkat olyan éren (saphena véna) végeztük, amelynek tulajdonságai patkányban jól ismertek. Jelen tanulmányban vizsgáltuk egyrészt (1) hogy milyen vénás károsodást indukál női nemi hormonhiányos patkányokban az egyik a legismertebb, érfal remodellinget eredményező faktor (ATII), másrészt (2) hogyan befolyásolja ezt a folyamatot a női nemi hormonpótlás.

Az ATII-infúzió használatával lehetőség nyílt homogén, egységes pathomechanizmusú hipertónia létrehozására. Használatát menopauza modellben elméletileg megerősíti az a klinikai tapasztalat, hogy a posztmenopauzában kialakuló hipertónia legjobban ACE-gátló/ARB kezelésre reagál, mely így közvetve igazolja, hogy a RAS a klinikumban is fontos szerepet játszik a hipertónia kialakulásában [264]. Kísérleteink során a vénák biomechanikai tulajdonságaira fókuszáltuk figyelmünket, mivel számos tanulmány kiemelte a vénás tónus és disztenziibilitás jelentőségét a korai és előrehaladott hipertóniában [254, 268]. A rövid-távú adaptációt a vénás kontraktilitás, míg a hosszú-távú, strukturális változásokat a disztenziibilitás jellemzi.

5.3.4.1. Az ATII hatása a vénás kontraktilitásra nemi hormonhiányban

A megnövekedett vénás tónus jelenléte jól ismert hipertóniában. Néhány modellben a magas vérnyomással társult korai változások között jelen van, míg egyéb esetekben csak bizonyos

vazoaktív anyagok, például a szerotonin segítségével váltható ki [268, 269]. A fokozott vénás tónus patológiás hatása a szisztémás keringésre ismert [254]. Menopauza modellünkben, ATII adását követően korai változásként megnövekedett *in vivo* vénás tónust észleltünk, amely *in vitro* csökkent maximális vénás relaxációban és változatlan maximális noradrenalin-indukált kontrakcióban mutatkozott meg. Mivel nem érhetőek el olyan hasonló tanulmányok, amelyek a hipertónia és a hormonpótló kezelés hatásait vizsgálják a vénás relaxációra, ezért eredményeinket csak hasonló, artériákon végzett mérésekkel tudjuk összevetni. Vénás eredményeinkhez hasonlóan Koller ovariektomizált állatokban a hormonpótló és intakt SHR patkányokhoz képest csökkent nyíróerő hatására kialakuló relaxációs választ talált artériákon [265, 270]. Az általunk észlelt változatlan noradrenalin-indukált vénás kontrakció összhangban áll Sudhir és munkatársai által leírtakkal, miszerint kutyákban előidézett renovaszkuláris hipertónia esetén a NA-indukált vénás kontraktilitás változatlan volt [268]. Érdekes módon a szerzők megnövekedett szerotonin-indukált kontraktilitást tapasztaltak [268]. Következésképpen, a változatlan NA-indukált tónus ellenére, elméletileg az egyéb endogén vazoaktív anyagok jelenlétének hatására növekvő kontraktilitás állhatott az *in vivo* vénás tónus fokozódásának hátterében.

5.3.4.2. A HPK hatásai a vénás kontraktilitásra ATII-indukált hipertóniában

A kombinált – ösztradiol és medroxiprogesteron tartalmú – hormonpótló kezelés szignifikánsan csökkentette az emelkedett vénás tónust, amelyet az ATII-kezelésben részesült hormonhiányos állatokban tapasztaltunk. A laboratóriumi állatokon végzett megfigyeléseink megfelelnek a humán vizsgálatokban, Goodrich, Wood, McCausland és munkatársaik által pletizmográfiás mérések során tapasztaltakkal [257, 271]. Másrészt viszont, Hohman és munkatársai vemhes patkányok mesenterialis vénáiban megnövekedett vénás tónust, míg idősödő állatok esetében csökkent vénás tónust regisztráltak [256]. *In vivo* és *in vitro* mérések alkalmazása révén vizsgálatunk jól jellemzi a hormonpótló kezelés vénás tónusra kifejtett hatásait.

In vitro megfigyeléseink során a hormonpótló kezelést követően megnövekedett relaxációt és csökkent kontrakciót tapasztaltunk, mindkettő alátámasztja az *in vivo* körülmények közt észlelt tónus csökkenést.

5.3.4.3. Az ATII hatásai a vénás disztenziabilitásra nemi hormonhiányos állatokban

Csökkent vénás compliancet és disztenziabilitást írtak le esszenciális és korai, vese eredetű hipertóniában [254, 272]. Ehhez hasonlóan, női nemi hormonhiányos állatokban az ATII-

indukált hipertónia csökkent vénás disztenzibilitást, azaz merevebb falú ereket eredményezett, ami arra utal, hogy már jelen lehetnek érfal szerkezeti változások [254, 272-274].

5.3.4.4. A hormonpótló kezelés hatásai a vénás disztenzibilitásra ATII-indukált hipertóniában

A hormonpótló kezelés vénás disztenzibilitásra kifejtett hatásait hipertóniában munkacsoportunkat megelőzően még nem tanulmányozták. Megfigyeléseink alapján a hormonpótló kezelés nem volt hatással az ATII által okozott csökkent vénás disztenzibilitásra. Így úgy tűnik, hogy a hormonpótló kezelés nem befolyásolja az ATII jól ismert, erős, érfal szerkezeti átépülést okozó hatását [50]. Érdekes módon, korábbi vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy mind a terhesség, mind az orális fogamzásgátlók (vagyis emelkedett nemi hormon szintekkel járó állapotok) növelték a vénás disztenzibilitást normotenzív állapotban [257, 262, 271]. Másrészt viszont preeclampsziában szenvedő nőkben csökkent vénás disztenzibilitást észleltek [275]. Elképzelhető, hogy kísérletünkben azért nem tapasztaltunk megnövekedett vénás disztenzibilitást, mert a hormonpótló kezelés során mért hormonszintek különböznek a várandósság, illetve az orális fogamzásgátlók használata során mért értékektől, valamint a hormonpótló kezelés nem tudja ellensúlyozni az ATII érfalra gyakorolt erőteljes hatásait. Megjegyzendő, hogy hasonlóan kettős – azaz hipertóniás és hormonális – hatás esetén, preeclampsziában is hasonló disztenzibilitás csökkenést észleltek [231].

5.3.4.5. További megállapítások

Az ATII infúzió (100 ng/kg/perc) mérsékelt hipertóniát indukált ovariektomizált állatokban. Az emelkedett vérnyomásra nem volt hatással a hormonpótló kezelés. ATII kezelés után megnövekedett in vivo vénás átmérőket mértünk. Ezt a hiperaldoszteronizmus és az megnövekedett plazma volumen eredményezhette [276]. Korábbi vizsgálatainkban normotenzív, ovariektómián átesett patkányok vénáiban a hormonpótló kezelés megnövekedett érátmérőt okozott [60], illetve normotenzív és hipertenzív állatok artériáiban is [58, 62]. ATII hipertóniás vénás vizsgálatunkban a hormonkezelés ehhez hasonló (vagyis érátmérő növelő) hatása nem mutatkozott, amelyet talán az a jól ismert hatás eredményezett, hogy a hormonpótló állatok testsúlya kisebb voltak [277, 278].

5.3.4.6. Konklúzió

Elsőként számoltunk be a női nemi hormonhiány és a hormonpótló kezelés kísérletes ATII-indukált hipertónia modellben vizsgált vénás biomechanikai és érreaktivitásra kifejtett hatásairól. Ismert, hogy a vénás rendszer mechanikai tulajdonságai fontos szerepet játszanak a

hipertónia kialakulásában és progressziójában [190, 279]. Eredményeink szerint a hormonpótló kezelés fokozta a vénás kontraktilitást (vagyis a gyors adaptációs választ), amely *in vivo* vénás tónus csökkenéssel járt. Másrészt, a vénás disztenzibilitás (vagyis a krónikus adaptáció) hormonpótló kezelés hatására nem mutatott növekedést a viszonylag rövidtávú, 1 hónapos kísérletes periódusunk során. Igazoltuk a hormonpótló kezelés vénás rendszerre gyakorolt előnyös rövidtávú hatásait. Ezek alapján további vizsgálatok szükségesek a hosszútávú hatások megítélésére. Mint minden állatmodell esetén, vénás eredményeink klinikai jelentőségét humán viszonyok között is érdemes megvizsgálni.

6. Összegzés, fontosabb eredmények, új megállapítások

6.1. Nemi különbségek koszorúsereken

- Balkamrai intramurális kis koszorúsereken *normális vérnyomás mellett és élettani viszonyok között* hímekben hasonló belső sugár mellett nagyobb a falvastagság, így nagyobb a fal/lumen hányados. Ez alacsonyabb izobárikus falfeszülést eredményezett hímekben, mint nőstényekben.
- A spontán tónus és a bradikininfüggő relaxáció nem mutatott nemi különbséget, ugyanakkor a maximális vazokonstrikció kifejezetten erősebb volt hímekben, mint nőstényekben.
- *Hipertóniában* az intramurális kis koszorúserek érfali mechanikai terhelés növekedése hímekben az egyik korai károsodás. Ezzel szemben a nőstények ereiben „inward eutroph” remodelling látható, mely stabilizálni próbálja a mechanikai terhelést, ugyanakkor nő a vaszkuláris rezisztencia – de ennek árán stabilizálódik a mikrocirkulációban a vérnyomás, tovább fenntartva lokálisan a normotóniás szintet.
- A hipertóniás adaptáció során hím patkányokban nagyobb a bal kamra vérellátását nagyrészt biztosító intramurális kis koszorúserek spontán tónusa és vazokonstriktor válasza, kisebb mértékű a relaxációs képessége, nőstényekhez képest. Ugyanakkor nőstényekben a szív hipertrófiája tapasztalható.

6.2. Hiperandrogén modellek fontosabb következtetései

Sikerült olyan állatkísérletes modelleket kialakítani, amelyekben a PCOS kezdeti elváltozásai tanulmányozhatóak.

- Adaptáltunk és továbbfejlesztettünk egy meglévő PCOS modellt, amely eredetileg hipertóniát is okozott, ezért az abban mért eredmények elkülönítése a hipertónia okozta károsodásoktól nem volt egyértelmű. Normális vérnyomású módosított modellünkben egyidejűleg lehet tanulmányozni a hiperandrogén állapot és a D-vitaminpótlás hatásait, a hiperandrogén állapotban jelentkező érkárosodások kezdeti lépéseit.

- Munkacsoportunk kifejlesztett, validált és alkalmazott egy olyan PCOS modellt, melyben a hiperandrogén állapot és a D-vitaminhiány károsító hatásait együtt és külön-külön is vizsgálni lehet.

Mindkét modell alkalmas a korai károsodások tanulmányozására, hogy megértsük a folyamatok első lépéseit és feltárjuk a lehetséges beavatkozási pontokat. A két modellben a PCOS-ra vonatkozó új felismeréseinket az alábbiakban összesítem.

6.2.1. A cukor- és inzulin anyagcserére vonatkozó eredmények áttekintése

- Mindkét modellben igazoltuk a szisztémás inzulin rezisztencia jelenléte mellett az egyidejű vaszkuláris inzulin rezisztenciát, azaz az inzulinra kialakuló vazorelaxáció csökkenését.
- Az első modellben igazoltuk, hogy a hiperandrogén hatásra létrejövő vaszkuláris inzulin rezisztencia D-vitamin hatására regionális különbségeket mutatón reagál; kisereken (a. gracilis) javul, aortán nem változik – ez a célszervi károsodások regionális különbségeire is magyarázatot adhat.
- Új modellünkben elsőként részleteiben igazoltuk, hogy a két károsító hatás eltérően okoz szisztémás inzulin rezisztenciát: a hiperandrogén állapot (tesztoszteron kezelés) változatlan inzulin szintek mellett magasabb terheléses vércukor értéket eredményez, míg D-vitaminhiányban magasabb inzulinszint szükséges a vércukorszint normalizálásához. A két noxa egyidejűleg emelkedett inzulin- és vércukorszintet eredményezett.
- Második, kombinált károsító hatásokon alapuló modellünkben a vaszkuláris inzulin hatás elemzésekor azt találtuk, hogy bármelyik noxa önmagában, elsősorban az NO-függő mechanizmus kiesésével jelentősen csökkentette az inzulinfüggő relaxációt kis koszorúsereken.

6.2.2. Első PCOS modellünk egyéb kiemelt eredményei

- Korai PCOS modellünkben gracilis arteriolán a DHT kezelés normális vérnyomás mellett az értumot növelte, az érfal vastagodása és a falkeresztmetszet szignifikáns növekedése nélkül, mely az érfal feszültséget (tangencionális stresszt) és a disztenziabilitást növelte, az elasztikus modulus módosítása nélkül. E változások korai prehipertenzív eltérésekként értelmezhetőek, melyeket a D-vitamin kezelés jelentős részben kivédett. Az elasztikus modulus változatlansága jelezte, hogy a folyamat

érdemi eltérést az érfal komponenseiben még nem okozott. Ugyanakkor a vaszkuláris reaktivitás vonatkozásában a DHT kezelés csökkentette az ér teljes szabályozási tartományát, mind a relaxációs, mind a kontrakciós irányban. D-vitamin kezelés a teljes tartományt kevésbé befolyásolta, de összességében relaxáltabb ereket eredményezett a DHT kezeléshez képest. A DHT kezelés elsősorban az NO függő relaxációt károsította, a D-vitamin kezelés kompenzációs hatása NO-tól független útvonalon érvényesült.

- Korai PCOS modelünkben aortán a DHT kezelés fokozta a vazokonstriktiót és elsősorban az NO-függő útvonal blokkolásával csökkentette az ACh relaxációt. D-vitamin kezelés a vazokonstriktiót a kontroll szintjére állította helyre, az ACh relaxációt mérsékelten javította. Indometacin kezelés a csoportok közötti relaxációs különbséget eltüntette – így feltételezhető, hogy a konstriktor – dilatátor prosztanoidok arány változása jelenti a finomabb szabályozás és kompenzáció útvonalát aortán. E vizsgálat segített azonosítani azt a jelenséget, miszerint a D-vitamin kezelés által mérsékelten fokozódó NO termelődést vazokonstriktor prosztanoidok nagyrészt ellensúlyozzák, ez okozhatja azt, hogy az ACh relaxációban nem láttunk számottevő változást a DHT kezeléshez képest. Ez a mechanizmus gracilis arteriolán kevésbé volt domináns, mint aortán.
- Az ösztrogén relaxáció hiperandrogén környezetben jelentősen csökken patkány aorta gyűrűkőn és ezt a D-vitamin kezelés nem befolyásolta. Az ösztrogén érvédő hatásának csökkenése lehet az egyik magyarázata a PCOS-ben jelentkező korai kardiovaszkuláris károsodásnak.
- Korai PCOS modellünkben az érfiziológiai változások hátterében az eNOS és COX₂ expresszió módosulását írtuk le aorta endotheliumban, mely az ösztrogén relaxáció csökkenése mellett szintén a kardiovaszkuláris kockázat fokozódása irányába mutat.
- E modellben a leukocitákban és az ovariumokban észlelt emelkedett PARP aktiváció igazolta hipotézisünket, miszerint a PCOS fokozza az oxidatív stresszt, amit az egyidejű D-vitamin kezelés mérsékel / kivédett. Ugyanakkor a DHT-kezelés feltehetően direkt PARP gátló hatásként szignifikánsan csökkentette a PARP aktivitást az aorta endothel és simaizom rétegeiben egyaránt és a D₃-vitamin kezelés ezt nem befolyásolta. Eredményeink alapján felmerül annak lehetősége, hogy az eltérő androgén metabolitok, illetve az eltérő szervek különböző PARP választ adnak – ennek az individuális reakciónak a háttere még nem ismert.

- Eredményeink emellett igazolják az adjuváns D₃-vitamin kezelés előnyös hatásait PCOS modellben. A szénhidrát metabolizmus mellett az ovariumban is majdnem teljesen visszaállította a DHT által okozott elváltozásokat. A D₃-vitamin-pótlás fokozta az eNOS expressziót, ami regionális különbségekkel részben fokozott acetil-kolin válaszkészséghez és relaxációs képességhez vezetett.
- A hiperandrogén állapot vastagabb, rugalmatlanabb vénafalat eredményezett, vénafal remodellinget észleltünk, amely értelmezhető a visszérkárosodás korai jeleként. A DHT hatására jelentkező visszerváltozásokat az egyidejű D₃-vitamin kezelés mérsékelte.

6.3. Menopauza – hormonpótlás érhatások

- Az ovariectomia fokozott TXA₂-kontrakciót és csökkent bradykinin-relaxációt hozott létre intramuralis coronaria arteriolákon. Az ösztrogén-kezelt állatok a kontrollokkal megegyező kontrakciós választ és nagyobb bradykinin-indukált relaxációt mutattak. Az ösztrogén-pótlás védelmet nyújtott a női nemi hormonhiány okozta vaszkuláris változások ellen.
- Az ösztradiol perifériás kisartériákon kifejtett, akut vazodilatációs hatása csökken a krónikus ösztradiol előkezelés hatására ovariectomizált állatokban. Ez a hatás nem calcium antagonist mechanizmussal valósul meg, hanem specifikus, ösztradiol függő hatás, azaz igazolja a krónikus ösztradiol pótlás közvetlen hatását perifériás kisartériákon. Egyidejűleg azt mutatja, hogy a női nemi hormonok genomikus és nem-genomikus hatásai között létezik kölcsönhatás.
- Munkacsoportunk írta le az ovariectomia és a női nemi hormonpótlás hatásait a vénás kontraktilitásra. A noradrenalin-indukálta tónus hormonhiányban csökkent, ez a jelenség kapcsolatban állhat a vénás kapacitancia funkció kontrolljának romlásával. A hormonpótlás helyreállította a noradrenalin-indukálta tónust, ugyanakkor relaxáltabb ereket eredményezett.
- Elsőként számoltunk be a női nemi hormonhiány és a hormonpótló kezelés ATII-hipertónia modellben vizsgált vénás biomechanikai hatásairól: az ATII kezelés fokozta, míg a hormonpótló kezelés csökkentette az *in vivo* vénás tónust. Másrészt, a vénás disztenziabilitás (vagyis a krónikus adaptáció) hormonpótló kezelés hatására nem változott a viszonylag rövid-távú, 1 hónapos kísérletes periódusunk során.

Igazoltuk a hormonpótló kezelés vénás rendszerre gyakorolt előnyös, rövid-távú érbiomechanikai és kontraktilitásra kifejtett hatásait.

A disszertációmban összefoglalt kísérletes munkáink eredményei is alátámasztották azt a klinikumból származó szakmai tapasztalatomat, miszerint a női nemi hormonok változásai rendkívül sokrétűen és életszakasztól függően a reprodukív és a kardiovaszkuláris egészség meghatározói. A korai, enyhébb eltérések optimalizálása javíthatja reprodukív korban a gyermekvállalás sikerességét, míg idősebb korban a kardiometabolikus egészséget. Ezért tartottam és tartom fontosnak az ismertetett kérdések vizsgálatát.

7. Irodalomjegyzék

1. Maas, A.H. and Y.E. Appelman, *Gender differences in coronary heart disease*. Neth Heart J, 2010. **18**(12): p. 598-602.
2. Bentley-Lewis, R., K. Koruda, and E.W. Seely, *The metabolic syndrome in women*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(10): p. 696-704.
3. Ginsberg, H.N., *Insulin resistance and cardiovascular disease*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 453-8.
4. Papadakis, G., et al., *Is cardiovascular risk in women with PCOS a real risk? Current insights*. Minerva Endocrinol, 2017. **42**(4): p. 340-355.
5. Rosano, G.M., et al., *Menopause and cardiovascular disease: the evidence*. Climacteric, 2007. **10 Suppl 1**: p. 19-24.
6. Hickey, M., R. Hart, and J.A. Keelan, *The relationship between umbilical cord estrogens and perinatal characteristics*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(6): p. 946-52.
7. Chen, Z., et al., *Effects of Estrogen in Gender-dependent Fetal Programming of Adult Cardiovascular Dysfunction*. Curr Vasc Pharmacol, 2019. **17**(2): p. 147-152.
8. Knowlton, A.A. and A.R. Lee, *Estrogen and the cardiovascular system*. Pharmacol Ther, 2012. **135**(1): p. 54-70.
9. Huang, A., et al., *Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1804-9.
10. Knot, H.J., et al., *Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca²⁺ and ecNOS activity*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. H961-9.
11. Orshal, J.M. and R.A. Khalil, *Gender, sex hormones, and vascular tone*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(2): p. R233-49.
12. Thompson, J. and R.A. Khalil, *Gender differences in the regulation of vascular tone*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(1-2): p. 1-15.
13. Meyfour, A., et al., *Y Chromosome Missing Protein, TBL1Y, May Play an Important Role in Cardiac Differentiation*. J Proteome Res, 2017. **16**(12): p. 4391-4402.
14. Alexander, B.T., *Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring*. Hypertension, 2003. **41**(3): p. 457-62.
15. Joyner, M.J., B.G. Wallin, and N. Charkoudian, *Sex differences and blood pressure regulation in humans*. Exp Physiol, 2016. **101**(3): p. 349-55.
16. Manti, M., et al., *Maternal androgen excess induces cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in female mice offspring*. Cardiovasc Res, 2019.
17. Bozdag, G., et al., *The prevalence and phenotypic features of polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod, 2016. **31**(12): p. 2841-2855.

18. Tal, R., D.B. Seifer, and A. Arici, *The emerging role of angiogenic factor dysregulation in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome*. Semin Reprod Med, 2015. **33**(3): p. 195-207.
19. Irani, M., et al., *Vitamin D Decreases Serum VEGF Correlating with Clinical Improvement in Vitamin D-Deficient Women with PCOS: A Randomized Placebo-Controlled Trial*. Nutrients, 2017. **9**(4).
20. Tata, B., et al., *Elevated prenatal anti-Mullerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood*. Nat Med, 2018. **24**(6): p. 834-846.
21. Teede, H., et al., *Anti-Mullerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines*. Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(7): p. 467-478.
22. Rotterdam, E.A.-S.P.C.W.G., *Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2004. **81**(1): p. 19-25.
23. Baldani, D.P., L. Skrgatic, and R. Ougouag, *Polycystic Ovary Syndrome: Important Underrecognised Cardiometabolic Risk Factor in Reproductive-Age Women*. Int J Endocrinol, 2015. **2015**: p. 786362.
24. Macut, D., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Polycystic Ovary Syndrome*. Curr Pharm Des, 2018. **24**(38): p. 4593-4597.
25. Dokras, A., *Cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome*. Semin Reprod Med, 2008. **26**(1): p. 39-44.
26. Alexandraki, K., et al., *Early microvascular and macrovascular dysfunction is not accompanied by structural arterial injury in polycystic ovary syndrome*. Hormones (Athens), 2006. **5**(2): p. 126-36.
27. Feldman, R.A., et al., *Antimullerian hormone levels and cardiometabolic risk in young women with polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2017. **107**(1): p. 276-281.
28. Scicchitano, P., et al., *Cardiovascular Risk in Women With PCOS*. Int J Endocrinol Metab, 2012. **10**(4): p. 611-8.
29. Pastoor, H., et al., *Sexual function in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Reprod Biomed Online, 2018. **37**(6): p. 750-760.
30. Palacios, C. and L. Gonzalez, *Is vitamin D deficiency a major global public health problem?* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt A**: p. 138-45.
31. He, C., et al., *Serum Vitamin D Levels and Polycystic Ovary syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Nutrients, 2015. **7**(6): p. 4555-77.
32. Pludowski, P., et al., *Vitamin D supplementation guidelines*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018. **175**: p. 125-135.
33. Bouillon, R., et al., *Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions*. Endocr Rev, 2019. **40**(4): p. 1109-1151.
34. Lin, M.W. and M.H. Wu, *The role of vitamin D in polycystic ovary syndrome*. Indian J Med Res, 2015. **142**(3): p. 238-40.
35. Takacs, I., et al., *[Hungarian consensus regarding the role of vitamin D in the prevention and treatment of diseases]*. Orv Hetil, 2012. **153 Suppl**: p. 5-26.

36. Pludowski, P., et al., *Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency*. Endokrynol Pol, 2013. **64**(4): p. 319-27.
37. Thornton, K., J. Chervenak, and G. Neal-Perry, *Menopause and Sexuality*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2015. **44**(3): p. 649-61.
38. Santoro, N. and J. Johnson, *Diagnosing the Onset of Menopause*. JAMA, 2019.
39. Metcalf, M.G., R.A. Donald, and J.H. Livesey, *Pituitary-ovarian function before, during and after the menopause: a longitudinal study*. Clin Endocrinol (Oxf), 1982. **17**(5): p. 489-94.
40. Greendale, G.A., et al., *Predicting the timeline to the final menstrual period: the study of women's health across the nation*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. 1483-91.
41. Jiang, B., et al., *Bayesian estimation of associations between identified longitudinal hormone subgroups and age at final menstrual period*. BMC Med Res Methodol, 2015. **15**: p. 106.
42. Rossi, R., et al., *Menopause and cardiovascular risk*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 325-8.
43. Jani, B. and C. Rajkumar, *Ageing and vascular ageing*. Postgrad Med J, 2006. **82**(968): p. 357-62.
44. de Villiers, T.J., et al., *Revised global consensus statement on menopausal hormone therapy*. Maturitas, 2016. **91**: p. 153-5.
45. Bassuk, S.S. and J.E. Manson, *The timing hypothesis: Do coronary risks of menopausal hormone therapy vary by age or time since menopause onset?* Metabolism, 2016. **65**(5): p. 794-803.
46. The, N.H.T.P.S.A.P., *The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society*. Menopause, 2017. **24**(7): p. 728-753.
47. Nudy, M., V.M. Chinchilli, and A.J. Foy, *A systematic review and meta-regression analysis to examine the 'timing hypothesis' of hormone replacement therapy on mortality, coronary heart disease, and stroke*. Int J Cardiol Heart Vasc, 2019. **22**: p. 123-131.
48. Mehta, J.M., R.C. Chester, and J.M. Kling, *The Timing Hypothesis: Hormone Therapy for Treating Symptomatic Women During Menopause and Its Relationship to Cardiovascular Disease*. J Womens Health (Larchmt), 2019. **28**(5): p. 705-711.
49. Varbiro, S., et al., *Intramural coronary artery constrictor reactivity to thromboxane is higher in male than in female rats*. Gynecol Endocrinol, 2006. **22**(1): p. 44-7.
50. Simon, G., G. Abraham, and G. Cserep, *Pressor and subpressor angiotensin II administration. Two experimental models of hypertension*. Am J Hypertens, 1995. **8**(6): p. 645-50.
51. Manneras, L., et al., *A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3781-91.

52. Przybylski, R., et al., *Vitamin D deficiency in the spontaneously hypertensive heart failure [SHHF] prone rat*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(9): p. 641-6.
53. Pan, Y., et al., *Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats*. J Ethnopharmacol, 2009. **124**(1): p. 98-102.
54. Marchand, K.C., E.J. Arany, and D.J. Hill, *Effects of atorvastatin on the regeneration of pancreatic {beta}-cells after streptozotocin treatment in the neonatal rodent*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(1): p. E92-E100.
55. Hadjadj, L., et al., *Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency: Vascular consequences*. Diab Vasc Dis Res, 2018. **15**(4): p. 294-301.
56. Huang-Doran, I. and S. Franks, *Genetic Rodent Models of Obesity-Associated Ovarian Dysfunction and Subfertility: Insights into Polycystic Ovary Syndrome*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 53.
57. Acs, N., et al., *The effect of ovariectomy and oestrogen replacement on small artery biomechanics in the rat*. Br J Obstet Gynaecol, 1999. **106**(2): p. 148-54.
58. Acs, N., et al., *Effects of combined sex hormone replacement therapy on small artery biomechanics in pharmacologically ovariectomized rats*. Maturitas, 2000. **34**(1): p. 83-92.
59. Acs, N., et al., *Estrogen improves impaired musculocutaneous vascular adrenergic reactivity in pharmacologically ovariectomized rats: a potential peripheral mechanism for hot flashes?* Gynecol Endocrinol, 2001. **15**(1): p. 68-73.
60. Varbiro, S., et al., *Sex hormone replacement therapy reverses decreased venous distensibility in pharmacologically ovariectomized rats*. Menopause, 2001. **8**(3): p. 204-9.
61. Varbiro, S., et al., *Hormone replacement reduces elevated in vivo venous tone in hypertensive ovariectomized rats*. J Soc Gynecol Investig, 2001. **8**(2): p. 98-103.
62. Varbiro, S., et al., *Effect of ovariectomy and hormone replacement therapy on small artery biomechanics in angiotensin-induced hypertension in rats*. J Hypertens, 2000. **18**(11): p. 1587-95.
63. Nadasy, G.L., et al., *Preparation of intramural small coronary artery and arteriole segments and resistance artery networks from the rat heart for microarteriography and for in situ perfusion video mapping*. Microvasc Res, 2001. **61**(3): p. 282-6.
64. Szekeres, M., et al., *Segmental differences in geometric, elastic and contractile characteristics of small intramural coronary arteries of the rat*. J Vasc Res, 1998. **35**(5): p. 332-44.
65. Mericli, M., et al., *Estrogen replacement therapy reverses changes in intramural coronary resistance arteries caused by female sex hormone depletion*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(2): p. 317-24.
66. Cox, R.H., *Three-dimensional mechanics of arterial segments in vitro: methods*. J Appl Physiol, 1974. **36**(3): p. 381-4.
67. Yanes, L.L., et al., *Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome*. Gend Med, 2011. **8**(2): p. 103-15.

68. Kakucs, R., et al., *Direct relaxing effect of estradiol-17beta and progesterone on rat saphenous artery*. Microvasc Res, 1998. **56**(2): p. 139-43.
69. Kakucs, R., et al., *Acute, nongenomic vasodilatory action of estradiol is attenuated by chronic estradiol treatment*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(6): p. 538-42.
70. Monos, E., et al., *Effect of long-term tilt on mechanical and electrical properties of rat saphenous vein*. Am J Physiol, 1989. **256**(4 Pt 2): p. H1185-91.
71. Matrai, M., et al., *Gender differences in biomechanical properties of intramural coronary resistance arteries of rats, an in vitro microarteriographic study*. J Biomech, 2007. **40**(5): p. 1024-30.
72. Pacher, P. and C. Szabo, *Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors*. Cardiovasc Drug Rev, 2007. **25**(3): p. 235-60.
73. Krus, S., M.W. Turjman, and E. Fiejka, *Comparative morphology of the hepatic and coronary artery walls. Part I. Differences in the distribution and intensity of non-atherosclerotic intimal thickening and atherosclerosis*. Med Sci Monit, 2000. **6**(1): p. 19-23.
74. Krus, S., Turjman, M.W., Fielka, E., *Comparative morphology of the hepatic and coronary artery walls. Part III. The significance of medial morphologic features in the determination of an autopsied unidentified subjects age*. Medical Science Monitor, 2001. **6** p. 629-631.
75. Ozolanta, I., et al., *Changes in the mechanical properties, biochemical contents and wall structure of the human coronary arteries with age and sex*. Med Eng Phys, 1998. **20**(7): p. 523-33.
76. Zhang, Y. and S.T. Davidge, *Estrogen replacement increases coronary artery distensibility in ovariectomized rats*. Can J Physiol Pharmacol, 1999. **77**(1): p. 75-8.
77. Kaski, J.C., *Overview of gender aspects of cardiac syndrome X*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(3): p. 620-6.
78. Wellman, G.C., et al., *Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1024-30.
79. Bowles, D.K., *Gender influences coronary L-type Ca(2+) current and adaptation to exercise training in miniature swine*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(6): p. 2503-10.
80. Kemp, B.K. and T.M. Cocks, *Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(5): p. 757-62.
81. Szekeres, M., et al., *Pharmacologic inhomogeneity between the reactivity of intramural coronary arteries and arterioles*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(4): p. 584-92.
82. Barber, D.A. and V.M. Miller, *Gender differences in endothelium-dependent relaxations do not involve NO in porcine coronary arteries*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2325-32.

83. Lamping, K.G. and D.W. Nuno, *Effects of 17 beta-estradiol on coronary microvascular responses to endothelin-1*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. H1117-24.
84. Jiang, C., et al., *Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1*. Am J Physiol, 1992. **263**(1 Pt 2): p. H271-5.
85. Karanian, J.W. and P.W. Ramwell, *Effect of gender and sex steroids on the contractile response of canine coronary and renal blood vessels*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **27**(3): p. 312-9.
86. Miller, V.M., D.A. Lewis, and D.A. Barber, *Gender differences and endothelium- and platelet-derived factors in the coronary circulation*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(2): p. 132-6.
87. Nobe, K., et al., *Distinct agonist responsibilities of the first and second branches of mouse mesenteric artery*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(3): p. 422-7.
88. Toyota, E., et al., *Dynamics of flow velocities in endocardial and epicardial coronary arterioles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1598-603.
89. Vis, M.A., et al., *Effect of ventricular contraction, pressure, and wall stretch on vessels at different locations in the wall*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2963-75.
90. Wappler, E.A., et al., *Network remodeling of intramural coronary resistance arteries in the aged rat: a statistical analysis of geometry*. Mech Ageing Dev, 2013. **134**(7-8): p. 307-13.
91. Pal, E., et al., *Vitamin D deficiency causes inward hypertrophic remodeling and alters vascular reactivity of rat cerebral arterioles*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192480.
92. Bonacasa, B., et al., *2-Methoxyestradiol attenuates hypertension and coronary vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats*. Maturitas, 2008. **61**(4): p. 310-6.
93. Unger, T., *The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2002. **89**(2A): p. 3A-9A; discussion 10A.
94. Mikolajczyk, T.P. and T.J. Guzik, *Adaptive Immunity in Hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2019. **21**(9): p. 68.
95. Kolodziej, A.R., et al., *Prognostic Role of Elevated Myeloperoxidase in Patients with Acute Coronary Syndrome: A Systemic Review and Meta-Analysis*. Mediators Inflamm, 2019. **2019**: p. 2872607.
96. Reckelhoff, J.F., *Gender differences in hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2018. **27**(3): p. 176-181.
97. Grigore, D., N.B. Ojeda, and B.T. Alexander, *Sex differences in the fetal programming of hypertension*. Gend Med, 2008. **5 Suppl A**: p. S121-32.
98. Ma, Y., et al., *Gender-specific reduction in contraction is associated with increased estrogen receptor expression in single vascular smooth muscle cells of female rat*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(3): p. 457-70.
99. Gragasin, F.S., et al., *Estrogen reduces angiotensin II-induced nitric oxide synthase and NAD(P)H oxidase expression in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 38-44.

100. Levy, A.S., et al., *Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**: p. 1075-87.
101. White, R.M., C.O. Rivera, and C.A. Davison, *Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 375-80.
102. Szekeres, M., et al., *Nitric oxide and prostaglandins modulate pressure-induced myogenic responses of intramural coronary arterioles*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(2): p. 242-9.
103. Tan, B.K., et al., *Upregulation of adiponectin receptor 1 and 2 mRNA and protein in adipose tissue and adipocytes in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome*. Diabetologia, 2006. **49**(11): p. 2723-8.
104. Trolle, B., et al., *Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: impact of metformin treatment in a randomized controlled study*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2234-8.
105. Thys-Jacobs, S., et al., *Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome*. Steroids, 1999. **64**(6): p. 430-5.
106. Wong, M.S., et al., *Chronic treatment with vitamin D lowers arterial blood pressure and reduces endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H1226-34.
107. Yiu, Y.F., et al., *Vitamin D deficiency is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. E830-5.
108. Sara, L., et al., *Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 462-8.
109. Lakhani, K., et al., *Internal carotid artery haemodynamics in women with polycystic ovaries*. Clin Sci (Lond), 2000. **98**(6): p. 661-5.
110. Luque-Ramirez, M., et al., *Obesity is the major determinant of the abnormalities in blood pressure found in young women with the polycystic ovary syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2141-8.
111. Soares, G.M., et al., *Increased arterial stiffness in nonobese women with polycystic ovary syndrome (PCOS) without comorbidities: one more characteristic inherent to the syndrome?* Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(3): p. 406-11.
112. Sasaki, A., et al., *Increased arterial stiffness in mildly-hypertensive women with polycystic ovary syndrome*. J Obstet Gynaecol Res, 2011. **37**(5): p. 402-11.
113. Agarwal, N., et al., *Metformin reduces arterial stiffness and improves endothelial function in young women with polycystic ovary syndrome: a randomized, placebo-controlled, crossover trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 722-30.
114. Meyer, C., B.P. McGrath, and H.J. Teede, *Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 471-8.
115. Arikan, S., et al., *The evaluation of endothelial function with flow-mediated dilatation and carotid intima media thickness in young nonobese polycystic ovary syndrome*

- patients; existence of insulin resistance alone may not represent an adequate condition for deterioration of endothelial function. *Fertil Steril*, 2009. **91**(2): p. 450-5.
116. Macut, D., et al., *Hypertension in polycystic ovary syndrome: Novel insights*. *Curr Hypertens Rev*, 2019.
 117. Tukaj, C., *Enhanced proliferation of aortal smooth muscle cells treated by 1,25(OH)2D3 in vitro coincides with impaired formation of elastic fibres*. *Int J Exp Pathol*, 2008. **89**(2): p. 117-24.
 118. Masszi, G., et al., *Effects of vitamin D3 derivative--calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model*. *Pharmacol Rep*, 2013. **65**(2): p. 476-83.
 119. Kravariti, M., et al., *Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(9): p. 5088-95.
 120. Soyman, Z., et al., *Serum paraoxonase 1 activity, asymmetric dimethylarginine levels, and brachial artery flow-mediated dilatation in women with polycystic ovary syndrome*. *Fertil Steril*, 2011. **95**(3): p. 1067-72.
 121. Cussons, A.J., G.F. Watts, and B.G. Stuckey, *Dissociation of endothelial function and arterial stiffness in nonobese women with polycystic ovary syndrome (PCOS)*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009. **71**(6): p. 808-14.
 122. Pludowski, P., et al., *Vitamin d status in central europe*. *Int J Endocrinol*, 2014. **2014**: p. 589587.
 123. Somjen, D., G.H. Posner, and N. Stern, *Less calcemic Vitamin D analogs enhance creatine kinase specific activity and modulate responsiveness to gonadal steroids in the vasculature*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **101**(4-5): p. 232-8.
 124. Tare, M., et al., *Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats*. *J Physiol*, 2011. **589**(Pt 19): p. 4777-86.
 125. Keller, J., et al., *Endothelial dysfunction in a rat model of PCOS: evidence of increased vasoconstrictor prostanoid activity*. *Endocrinology*, 2011. **152**(12): p. 4927-36.
 126. Weishaar, R.E. and R.U. Simpson, *Vitamin D3 and cardiovascular function in rats*. *J Clin Invest*, 1987. **79**(6): p. 1706-12.
 127. Fernandes, G.S., et al., *Can vitamins C and E restore the androgen level and hypersensitivity of the vas deferens in hyperglycemic rats?* *Pharmacol Rep*, 2011. **63**(4): p. 983-91.
 128. Montano, L.M., et al., *Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade*. *Endocrinology*, 2008. **149**(5): p. 2517-26.
 129. Castillo, C., et al., *[Testosterone inhibits the contractile responses to phenylephrine associated with the release of intracellular calcium in rat aorta]*. *Gac Med Mex*, 2006. **142**(1): p. 1-8.

130. Miller, K.K., et al., *Effects of testosterone therapy on cardiovascular risk markers in androgen-deficient women with hypopituitarism*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(7): p. 2474-9.
131. Cornoldi, A., et al., *Effects of chronic testosterone administration on myocardial ischemia, lipid metabolism and insulin resistance in elderly male diabetic patients with coronary artery disease*. Int J Cardiol, 2010. **142**(1): p. 50-5.
132. Adams, M.R., J.K. Williams, and J.R. Kaplan, *Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 562-70.
133. Lakhani, K., et al., *Microvascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod, 2005. **20**(11): p. 3219-24.
134. Diamanti-Kandarakis, E., et al., *Inflammatory and endothelial markers in women with polycystic ovary syndrome*. Eur J Clin Invest, 2006. **36**(10): p. 691-7.
135. Steinberg, H.O., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1172-9.
136. Scherrer, U., et al., *Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2511-5.
137. Tack, C.J., et al., *Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilation in humans*. Hypertension, 1996. **28**(3): p. 426-32.
138. Yki-Jarvinen, H. and T. Utriainen, *Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology?* Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 369-79.
139. Juncos, L.A. and S. Ito, *Disparate effects of insulin on isolated rabbit afferent and efferent arterioles*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1981-5.
140. Ghafouri, S., S. Hajizadeh, and A.R. Mani, *Enhancement of insulin-induced cutaneous vasorelaxation by exercise in rats: A role for nitric oxide and K(Ca²⁺) channels*. Eur J Pharmacol, 2011. **652**(1-3): p. 89-95.
141. Gonzales, R.J., et al., *Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(2): p. H578-85.
142. Gericke, A., et al., *Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1602-8.
143. Peuler, J.D., et al., *Sex-specific effects of an insulin secretagogue in stroke-prone hypertensive rats*. Hypertension, 1993. **22**(2): p. 214-20.
144. Ngo, D.T., et al., *Determinants of insulin responsiveness in young women: Impact of polycystic ovarian syndrome, nitric oxide, and vitamin D*. Nitric Oxide, 2011. **25**(3): p. 326-30.
145. Cardus, A., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter*. Atherosclerosis, 2009. **204**(1): p. 85-9.
146. Malkin, C.J., et al., *Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man*. Clin Sci (Lond), 2006. **111**(4): p. 265-74.

147. Torres, I.P., et al., *Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome*. Life Sci, 2007. **80**(23): p. 2170-80.
148. Miller, V.M., *Sex-based differences in vascular function*. Womens Health (Lond), 2010. **6**(5): p. 737-52.
149. Andersen, H.L., et al., *Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(1): p. 159-68.
150. New, G., et al., *Long-term oestrogen treatment does not alter systemic arterial compliance and haemodynamics in biological males*. Coron Artery Dis, 2000. **11**(3): p. 253-9.
151. Li, M., L. Kuo, and J.N. Stallone, *Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2444-55.
152. Schulman, I.H., et al., *Dissociation between metabolic and vascular insulin resistance in aging*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H853-9.
153. Kim, J.A., et al., *Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(2): p. E201-8.
154. Dellipizzi, A., et al., *Contribution of constrictor prostanoids to the calcium-dependent basal tone in the aorta from rats with aortic coarctation-induced hypertension: relationship to nitric oxide*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(1): p. 75-81.
155. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 375-429.
156. Horvath, E.M., et al., *Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus*. Diabetologia, 2009. **52**(5): p. 952-61.
157. Xu, Z.R., et al., *Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H(2)O(2)-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK*. Eur J Pharmacol, 2010. **643**(2-3): p. 254-9.
158. Puurunen, J., et al., *Unfavorable hormonal, metabolic, and inflammatory alterations persist after menopause in women with PCOS*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(6): p. 1827-34.
159. Pacher, P. and C. Szabo, *Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease*. Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 2-13.
160. Duleba, A.J., *Medical management of metabolic dysfunction in PCOS*. Steroids, 2012. **77**(4): p. 306-11.
161. Gonzalez, F., *Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction*. Steroids, 2012. **77**(4): p. 300-5.
162. Elia, E., et al., *The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice*. Mol Hum Reprod, 2006. **12**(8): p. 475-81.
163. Lakhani, K., et al., *Aortic function is compromised in a rat model of polycystic ovary syndrome*. Hum Reprod, 2006. **21**(3): p. 651-6.

164. Sara, L., et al., *Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - effects of parallel vitamin D3 treatment*. Acta Physiol Hung, 2012. **99**(3): p. 279-88.
165. Sara, L., et al., *Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model - vascular effects of parallel vitamin D(3) treatment*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(12): p. 961-4.
166. Rezvanfar, M.A., et al., *Mechanistic links between oxidative/nitrosative stress and tumor necrosis factor alpha in letrozole-induced murine polycystic ovary: biochemical and pathological evidences for beneficial effect of pioglitazone*. Hum Exp Toxicol, 2012. **31**(9): p. 887-97.
167. Rezvanfar, M.A., et al., *Molecular mechanisms of a novel selenium-based complementary medicine which confers protection against hyperandrogenism-induced polycystic ovary*. Theriogenology, 2012. **78**(3): p. 620-31.
168. Kinuta, K., et al., *Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads*. Endocrinology, 2000. **141**(4): p. 1317-24.
169. Masszi, G., et al., *Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2013. **99**(2): p. 573-8.
170. Maestro, B., et al., *Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **84**(2-3): p. 223-30.
171. Oh, J.Y. and E. Barrett-Connor, *Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study*. Metabolism, 2002. **51**(3): p. 356-9.
172. Ortlepp, J.R., et al., *The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease*. Diabet Med, 2001. **18**(10): p. 842-5.
173. Zeitz, U., et al., *Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 509-11.
174. Hypponen, E., et al., *Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study*. Lancet, 2001. **358**(9292): p. 1500-3.
175. Pittas, A.G., et al., *Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women*. Diabetes Care, 2006. **29**(3): p. 650-6.
176. Thomson, R.L., S. Spedding, and J.D. Buckley, *Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **77**(3): p. 343-50.
177. Capri, M., et al., *Complexity of anti-immunosenescence strategies in humans*. Artif Organs, 2006. **30**(10): p. 730-42.
178. Krishnan, A.V. and D. Feldman, *Molecular pathways mediating the anti-inflammatory effects of calcitriol: implications for prostate cancer chemoprevention and treatment*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(1): p. R19-38.
179. Mabley, J.G., et al., *Inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase by the active form of vitamin D*. Int J Mol Med, 2007. **19**(6): p. 947-52.

180. Zittermann, A., S.S. Schleithoff, and R. Koerfer, *Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective*. Br J Nutr, 2005. **94**(4): p. 483-92.
181. Villaggio, B., S. Soldano, and M. Cutolo, *1,25-dihydroxyvitamin D3 downregulates aromatase expression and inflammatory cytokines in human macrophages*. Clin Exp Rheumatol, 2012. **30**(6): p. 934-8.
182. Walch, K., A. Kolbus, and K. Hefler-Frischmuth, *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in premenopausal women with polycystic ovary syndrome*. Maturitas, 2008. **61**(3): p. 256-9.
183. Skogastierna, C., et al., *A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress*. Eur J Prev Cardiol, 2014. **21**(8): p. 1049-54.
184. Perreault, M. and A. Marette, *Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1138-43.
185. Shimabukuro, M., et al., *Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 290-5.
186. Xiang, W., et al., *[1,25(OH)(2)D(3) influences endothelial cell proliferation, apoptosis and endothelial nitric oxide synthase expression of aorta in apolipoprotein E-deficient mice]*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2011. **49**(11): p. 829-33.
187. Gusic, R.J., et al., *Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo*. J Biomech, 2005. **38**(9): p. 1760-9.
188. Jiang, Z., et al., *A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H240-5.
189. Nheu, L., et al., *Physiological effects of androgens on human vascular endothelial and smooth muscle cells in culture*. Steroids, 2011. **76**(14): p. 1590-6.
190. Monos, E., V. Berczi, and G. Nadasy, *Local control of veins: biomechanical, metabolic, and humoral aspects*. Physiol Rev, 1995. **75**(3): p. 611-66.
191. Ciardullo, A.V., et al., *High endogenous estradiol is associated with increased venous distensibility and clinical evidence of varicose veins in menopausal women*. J Vasc Surg, 2000. **32**(3): p. 544-9.
192. Kendler, M., et al., *Elevated sex steroid hormones in great saphenous veins in men*. J Vasc Surg, 2010. **51**(3): p. 639-46.
193. Iannuzzi, A., et al., *Varicose veins of the lower limbs and venous capacitance in postmenopausal women: relationship with obesity*. J Vasc Surg, 2002. **36**(5): p. 965-8.
194. Hinek, A., et al., *Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Connect Tissue Res, 1991. **26**(3): p. 155-66.
195. Pierce, R.A., M.E. Kolodziej, and W.C. Parks, *1,25-Dihydroxyvitamin D3 represses tropoelastin expression by a posttranscriptional mechanism*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11593-9.
196. Tukaj, C. and T. Wrzolkowa, *Effects of vitamin D on aortic smooth muscle cells in culture*. Toxicol In Vitro, 1996. **10**(6): p. 701-11.
197. Haviarova, Z., et al., *Expression of constitutive nitric oxide synthase isoforms in varicose vein wall; preliminary results*. Int J Vasc Med, 2011. **2011**: p. 204723.

198. Brookes, Z.L., et al., *Pkd2 mesenteric vessels exhibit a primary defect in endothelium-dependent vasodilatation restored by rosiglitazone*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **304**(1): p. H33-41.
199. Masszi, G., et al., *Reduced estradiol-induced vasodilation and poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in the aortas of rats with experimental polycystic ovary syndrome (PCOS)*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e55589.
200. Zhou, Q.G., et al., *Vascular insulin resistance related to endoplasmic reticulum stress in aortas from a rat model of chronic kidney disease*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(9): p. H1154-65.
201. Xu, S., et al., *Caveolin-1 scaffolding domain promotes leukocyte adhesion by reduced basal endothelial nitric oxide-mediated ICAM-1 phosphorylation in rat mesenteric venules*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(10): p. H1484-93.
202. Racz, A., et al., *Thromboxane A(2) contributes to the mediation of flow-induced responses of skeletal muscle venules: role of cyclooxygenases 1 and 2*. J Vasc Res, 2009. **46**(5): p. 397-405.
203. Osterlund, K.L., R.J. Handa, and R.J. Gonzales, *Dihydrotestosterone alters cyclooxygenase-2 levels in human coronary artery smooth muscle cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(4): p. E838-45.
204. Molinari, C., et al., *1alpha,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **27**(6): p. 661-8.
205. Wehr, E., et al., *Association of hypovitaminosis D with metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(4): p. 575-82.
206. Krul-Poel, Y.H., et al., *The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review*. Eur J Endocrinol, 2013. **169**(6): p. 853-65.
207. Kotsa, K., et al., *Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome*. Fertil Steril, 2009. **92**(3): p. 1053-8.
208. Mishra, S., A.K. Das, and S. Das, *Hypovitaminosis D and Associated Cardiometabolic Risk in Women with PCOS*. J Clin Diagn Res, 2016. **10**(5): p. BC01-4.
209. Joham, A.E., et al., *Vitamin D in polycystic ovary syndrome: Relationship to obesity and insulin resistance*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(1): p. 110-8.
210. Jukic, A.M.Z., et al., *Increasing serum 25-hydroxyvitamin D is associated with reduced odds of long menstrual cycles in a cross-sectional study of African American women*. Fertil Steril, 2016. **106**(1): p. 172-179 e2.
211. Pal, L., et al., *Vitamin D Status Relates to Reproductive Outcome in Women With Polycystic Ovary Syndrome: Secondary Analysis of a Multicenter Randomized Controlled Trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(8): p. 3027-35.
212. Irani, M. and Z. Merhi, *Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: a systematic review*. Fertil Steril, 2014. **102**(2): p. 460-468 e3.
213. Farr, O.M., A. Gavrieli, and C.S. Mantzoros, *Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity?* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015. **22**(5): p. 353-9.
214. Kong, J., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates leptin expression in mouse adipose tissue*. J Endocrinol, 2013. **216**(2): p. 265-71.

215. Duckles, S.P. and V.M. Miller, *Hormonal modulation of endothelial NO production*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 841-51.
216. Hadjadj, L., et al., *Geometric, elastic and contractile-relaxation changes in coronary arterioles induced by Vitamin D deficiency in normal and hyperandrogenic female rats*. Microvasc Res, 2019. **122**: p. 78-84.
217. Hadjadj, L., et al., *Vitamin D deficiency and androgen excess result eutrophic remodeling and reduced myogenic adaptation in small cerebral arterioles in female rats*. Gynecol Endocrinol, 2019. **35**(6): p. 529-534.
218. Pal, E., et al., *Gender, hyperandrogenism and vitamin D deficiency related functional and morphological alterations of rat cerebral arteries*. PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0216951.
219. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group*. JAMA, 1998. **280**(7): p. 605-13.
220. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
221. Acs, N., et al., *The effects of postmenopausal hormone replacement therapy on hemostatic variables: a meta-analysis of 46 studies*. Gynecol Endocrinol, 2002. **16**(4): p. 335-46.
222. Collins, P., *Clinical cardiovascular studies of hormone replacement therapy*. Am J Cardiol, 2002. **90**(1A): p. 30F-34F.
223. Moreau, K.L., et al., *Regular exercise, hormone replacement therapy and the age-related decline in carotid arterial compliance in healthy women*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(3): p. 861-8.
224. Nagai, Y., et al., *Influence of age and postmenopausal estrogen replacement therapy on carotid arterial stiffness in women*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(1): p. 307-11.
225. Szelke, E., et al., *Effects of estrogen and progestin on the CO₂ sensitivity of hemispheric cerebral blood volume*. Menopause, 2008. **15**(2): p. 346-51.
226. Szelke, E., et al., *Effects of estrogen and progestin on hypothalamic blood flow autoregulation*. J Soc Gynecol Investig, 2005. **12**(8): p. 604-9.
227. Bekesi, G., et al., *In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes*. Steroids, 2000. **65**(12): p. 889-94.
228. Bekesi, G., et al., *Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy*. BJOG, 2001. **108**(5): p. 474-81.
229. Bekesi, G., et al., *Plasma concentration of myeloperoxidase enzyme in pre- and post-climacterial people: related superoxide anion generation*. Exp Gerontol, 2001. **37**(1): p. 137-48.
230. Bekesi, G., et al., *Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophil granulocytes*. Horm Metab Res, 2004. **36**(3): p. 155-63.

231. Stark, J., et al., *Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone*. Gynecol Endocrinol, 2015. **31**(1): p. 31-5.
232. Magness, R.R., C.R. Parker, Jr., and C.R. Rosenfeld, *Systemic and uterine responses to chronic infusion of estradiol-17 beta*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. E690-8.
233. Gilligan, D.M., et al., *Effects of estrogen replacement therapy on peripheral vasomotor function in postmenopausal women*. Am J Cardiol, 1995. **75**(4): p. 264-8.
234. Reis, S.E., et al., *Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women*. Circulation, 1994. **89**(1): p. 52-60.
235. Sudhir, K., et al., *Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(3): p. 807-14.
236. Jiang, C.W., et al., *Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro*. Br J Pharmacol, 1991. **104**(4): p. 1033-7.
237. Evagelatou, M. and J. Farrant, *Effect of oestradiol-17 beta on the expression of oestrogen receptor mRNA in human tonsillar cells*. J Mol Endocrinol, 1995. **14**(1): p. 13-9.
238. Blumenthal, R.S., et al., *Long-term estrogen therapy abolishes acute estrogen-induced coronary flow augmentation in postmenopausal women*. Am Heart J, 1997. **133**(3): p. 323-8.
239. Collins, P., et al., *Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 1964-8.
240. Bell, D.R., et al., *Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries*. Am J Physiol, 1995. **268**(1 Pt 2): p. H377-83.
241. Han, S.Z., et al., *17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery*. Circulation, 1995. **91**(10): p. 2619-26.
242. Zhang, F., et al., *17 beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line*. Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 1): p. C975-80.
243. Rosano, G.M., et al., *Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease*. Lancet, 1993. **342**(8864): p. 133-6.
244. Volterrani, M., et al., *Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women*. Am J Med, 1995. **99**(2): p. 119-22.
245. Leonardo, F., et al., *Effect of acute administration of estradiol 17 beta on aortic blood flow in menopausal women*. Am J Cardiol, 1997. **80**(6): p. 791-3.
246. Lang, L.M., et al., *Molecular cloning of a rat uterine gap junction protein and analysis of gene expression during gestation*. Am J Physiol, 1991. **260**(5 Pt 1): p. E787-93.
247. Petrocelli, T. and S.J. Lye, *Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone*. Endocrinology, 1993. **133**(1): p. 284-90.

248. Hortovanyi, E., et al., *Connexin 43 expression in rat aortic smooth muscle after ovariectomy and hormonal replacement*. Pathol Res Pract, 2001. **197**(2): p. 109-12.
249. Liang, Y.L., et al., *Effects of oestrogen and progesterone on age-related changes in arteries of postmenopausal women*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(6): p. 457-9.
250. Nabulsi, A.A., et al., *Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators*. N Engl J Med, 1993. **328**(15): p. 1069-75.
251. Austin, C.E., *Chronic and acute effects of oestrogens on vascular contractility*. J Hypertens, 2000. **18**(10): p. 1365-78.
252. Daly, E., et al., *Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy*. Lancet, 1996. **348**(9033): p. 977-80.
253. Gerhard, M., et al., *Estradiol therapy combined with progesterone and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women*. Circulation, 1998. **98**(12): p. 1158-63.
254. Haraldsson, B., H. Nilsson, and B. Folkow, *Structurally reduced distensibility of cardiovascular low-pressure' compartments in primary hypertension, as studied in spontaneously hypertensive rats (SHR)*. Acta Physiol Scand, 1981. **112**(4): p. 473-80.
255. Sumner, D.S., *Venous dynamics--varicosities*. Clin Obstet Gynecol, 1981. **24**(3): p. 743-60.
256. Hohmann, M., D. Zoltan, and W. Kunzel, *Age and reproductive status affect basal venous tone in the rat*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1996. **68**(1-2): p. 185-9.
257. Goodrich, S.M. and J.E. Wood, *Peripheral Venous Distensibility and Velocity of Venous Blood Flow during Pregnancy or during Oral Contraceptive Therapy*. Am J Obstet Gynecol, 1964. **90**: p. 740-4.
258. Gisclard, V., N.A. Flavahan, and P.M. Vanhoutte, *Alpha adrenergic responses of blood vessels of rabbits after ovariectomy and administration of 17 beta-estradiol*. J Pharmacol Exp Ther, 1987. **240**(2): p. 466-70.
259. Jilma, B., et al., *In vivo study of the effect of exogenous estradiol on alpha-adrenoceptor responsiveness of human veins*. J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **23**(6): p. 859-63.
260. Hart, M.V., et al., *Hemodynamics during pregnancy and sex steroid administration in guinea pigs*. Am J Physiol, 1985. **249**(2 Pt 2): p. R179-85.
261. Clarke-Pearson, D.L. and F.R. Jelovsek, *Alterations of occlusive cuff impedance plethysmography results in the obstetric patient*. Surgery, 1981. **89**(5): p. 594-8.
262. Fawer, R., et al., *Effect of the menstrual cycle, oral contraception and pregnancy on forearm blood flow, venous distensibility and clotting factors*. Eur J Clin Pharmacol, 1978. **13**(4): p. 251-7.
263. Staessen, J., A. Amery, and R. Fagard, *Isolated systolic hypertension in the elderly*. J Hypertens, 1990. **8**(5): p. 393-405.
264. Stimpel, M., B. Koch, and S. Oparil, *Antihypertensive treatment in postmenopausal women: results from a prospective, randomized, double-blind, controlled study*

- comparing an ACE inhibitor (moexipril) with a diuretic (hydrochlorothiazide).* Cardiology, 1998. **89**(4): p. 271-6.
265. Huang, A., et al., *Estrogen preserves regulation of shear stress by nitric oxide in arterioles of female hypertensive rats.* Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 309-14.
 266. Kauser, K. and G.M. Rubanyi, *Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats.* Hypertension, 1995. **25**(4 Pt 1): p. 517-23.
 267. Davis, G.K., et al., *Androgen Receptor Blockade Differentially Regulates Blood Pressure in Growth-Restricted Versus Ovarian Deficient Rats.* Hypertension, 2019: p. HYPERTENSIONAHA11913257.
 268. Sudhir, K., J.J. Smolich, and J.A. Angus, *Venous reactivity in canine renovascular hypertension.* Clin Exp Hypertens A, 1990. **12**(4): p. 507-31.
 269. Martin, D.S., M.C. Rodrigo, and C.W. Appelt, *Venous tone in the developmental stages of spontaneous hypertension.* Hypertension, 1998. **31**(1): p. 139-44.
 270. Koller, A. and A. Huang, *Development of nitric oxide and prostaglandin mediation of shear stress-induced arteriolar dilation with aging and hypertension.* Hypertension, 1999. **34**(5): p. 1073-9.
 271. McCausland, A.M., et al., *Venous distensibility during pregnancy.* Am J Obstet Gynecol, 1961. **81**: p. 472-9.
 272. Simon, G., M.B. Pamnani, and H.W. Overbeck, *Decreased venous compliance in dogs with chronic renal hypertension.* Proc Soc Exp Biol Med, 1976. **152**(1): p. 122-5.
 273. Greenberg, S., E.C. Palmer, and W.M. Wilborn, *Pressure-independent hypertrophy of veins and pulmonary arteries of spontaneously hypertensive rats. Characterization of function, structural and histochemical changes.* Clin Sci Mol Med Suppl, 1978. **4**: p. 31s-36s.
 274. Rosenberger, A., O. Adler, and H. Lichtig, *Angiographic appearance of the renal vein in a case of fibromuscular dysplasia of the artery.* Radiology, 1976. **118**(3): p. 579-80.
 275. Sakai, K., et al., *Venous distensibility during pregnancy. Comparisons between normal pregnancy and preeclampsia.* Hypertension, 1994. **24**(4): p. 461-6.
 276. Kuchel, O., et al., *Unilateral juxtaglomerular hyperplasia, hyperreninism and hypokalaemia relieved by nephrectomy.* J Hum Hypertens, 1993. **7**(1): p. 71-8.
 277. Sayegh, R.A., et al., *Impact of hormone replacement therapy on the body mass and fat compositions of menopausal women: a cross-sectional study.* Menopause, 1999. **6**(4): p. 312-5.
 278. van Seumeren, I., *Weight gain and hormone replacement therapy: are women's fears justified?* Maturitas, 2000. **34 Suppl 1**: p. S3-8.
 279. Safar, M.E. and G.M. London, *Venous system in essential hypertension.* Clin Sci (Lond), 1985. **69**(5): p. 497-504.

8. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

8.1. PhD értekezéshez kapcsolódó közlemények

1. Kakucs R, **Varbiro S**, Székács B., Nádasy G. L., Ács N., Monos E. Direct relaxing effect of estradiol 17beta and progesterone on rat saphenous arteries. *Microvascular Research*. 1998;56: 139-143. IF: 1,496
2. Acs N., Szekacs B., Nadasy G. L., **Varbiro S**, Kakucs R., Monos E. The effects of ovariectomy and hormon replacement on biomechanical properties of small arteries in rats. *BJOG*. 1999;106:148-154. IF: 2,657
3. Acs N., Szekacs B., Nadasy G. L., Laszlo A., **Varbiro S**, Miklos Z., jr. Szentivanyi M., Monos E. Effects of combined sex hormone replacement therapy on small artery biomechanics in pharmacologically ovariectomized rats. *Maturitas*. 2000;34:83-92. IF: 1,402
4. Szekacs B, Vajo Z, **Varbiro S**, Kakucs R, Vaslaki L, Acs N, Mucsi I, Brinton A. Postmenopausal hormone replacement improves proteinuria and impaired creatinine clearance in type 2 diabetes mellitus and hypertension. *BJOG*. 2000;107(8):1017-1021. IF: 2,349
5. Bekesi G, Kakucs R, **Varbiro S**, Racz K, Sprintz D, Feher J, Szekacs B. In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids* 2000;65:889-894. IF: 1,831
6. **Varbiro S**, Nadasy GL, Monos E, Vajo Z, Acs N, Miklos Z, Tokes AM, Szekacs B. Effect of ovariectomy and hormone replacement therapy on small artery biomechanics in angiotensin- induced hypertension in rats. *J Hypertens*. 2000;18:1587-95. IF 3,640
7. **Varbiro S**, Nadasy GL, Monos E, Acs N, Vajo Z, Szekacs B. Sex hormone replacement therapy reverses decreased venous distensibility in pharmacologically ovariectomized rats. *Menopause* 2001; 8:204-209. IF:3,505

8.2. MTA doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

8. Hortovanyi E, **Varbiro S**, Tokes AM, Illyes G, Szekacs B, Paku S, Kerenyi T, Kadar A. Connexin 43 expression in rat aortic smooth muscle after ovariectomy and hormonal replacement. *Pathol Res Pract* 2001;197:109-112. IF: 1,163
9. Nadasy GL, Szekeres M, Dezsi L, **Varbiro S**, Szekacs B, Monos E. Preparation of intramural small coronary artery and arteriole segments and resistance artery networks from the rat heart for microarteriography and for in situ perfusion video mapping. *Microvasc Res.* 2001;61:282-286. IF: 1,474
10. **Varbiro S**, Vajo Z, Nadasy GL, Monos E, Acs N, Szekacs B. Hormone replacement reduces elevated in vivo venous tone in hypertensive ovariectomized rats. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8:98-103. IF 2,830
11. Kakucs R, **Varbiro S**, Nadasy GL, Monos E, Szekacs B. Acute, nongenomic vasodilatory action of estradiol is attenuated by chronic estradiol treatment. *Exp Biol Med (Maywood) /formerly P Soc Exp Biol Med./* 2001;226:538-542. /IF: 3,321/
12. **Varbiro S**, Vajo Z, Nadasy GL, Monos E, Acs N, Lorant M, Felicetta JV, Szekacs B. Sex hormone replacement therapy reverses altered venous contractility in rats after pharmacological ovariectomy. *Menopause.* 2002; 9:122-126. IF:3,217
13. Mericli M, Nadasy GL, Szekeres M, **Varbiro S**, Vajo Z, Matrai M, Acs N, Monos E, Szekacs B. Estrogen replacement therapy reverses changes in intramural coronary resistance arteries caused by female sex hormone depletion. *Cardiovasc Res.* 2004; 61:317-324. IF: 4,575
14. **Varbiro S**, Matrai M, Szekeres M, Nadasy GL, Szaky E, Mericli M, Banhidy F, Monos E, Szekacs B. Intramural coronary artery constrictor reactivity to thromboxane is higher in male than in female rats. *Gynecol Endocrinol*, 2006; 22: 44–47. IF: 0,995
15. Matrai M, Mericli M, Nadasy GL, Szekeres M, **Varbiro S**, Banhidy F, Acs N, Monos E, Szekacs B. Gender differences in biomechanical properties of intramural coronary resistance arteries of rats, an in vitro microarteriographic study. *J Biomech.* IF: 2,897
16. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GL, **Varbiro S**. Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2012;97: 462-468. IF: 4,174

17. Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Monori-Kiss A, Szekeres M, Masszi G, Monos E, **Várbiro Sz**. Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model – vascular effects of parallel vitamin D3 treatment *Gynecol Endocrinol*. 2012; 28:961-964. IF: 1,303
18. Sára L, Nádasy GyL, Antal P, Szekeres M, Monori-Kiss A, Horváth EM, Tőkés AM, Masszi G, Monos E, **Várbiro Sz** Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - Effects of parallel vitamin D3 treatment. *Acta Physiol Hung*. 2012; 99:279-288. IF: 0,882
19. Matrai M, Hetthessy J, Nádasy GL, Monos E, Szekacs B, **Varbiro S**. Sex Differences in the Biomechanics and Contractility of Intramural Coronary Arteries in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Gender Med*. 2012; 9:548-556. IF: 1,690
20. Masszi G, Buday A, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, Sara L, Revesz C, Benko R, Nádasy GL, Benyo Z, Hamar P, **Varbiro S**. Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2013; 99:573-578. IF: 4,295
21. Masszi G, Horvath EM, Tarszabo R, Benko R, Novak A, Buday A, Tokes AM, Nádasy NL, Hamar P, Benyó Z, **Varbiro Sz**. Reduced Estradiol-Induced Vasodilation and Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Activity in the Aortas of Rats with Experimental Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) *PLOS ONE*. 2013; 8:(3) Paper e55589. 7 p. IF: 3,534
22. Masszi G, Novak A, Tarszabo R, Horvath EM, Buday A, Ruisanchez E, Tokes AM, Sara L, Benko R, Nádasy GL, Revesz C, Hamar P, Benyó Z, **Varbiro S**. Effects of vitamin D3 derivative--calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacol Rep*. 2013;65(2):476-483. IF: 2,165
23. Masszi G , Benko R , Csibi N , Horvath EM , Tokes AM , Novak A , Beres NJ , Tarszabo R , Buday A , Repas Cs , Bekesi G , Patocs A , Nádasy GyL , Hamar P , Benyo Z , **Varbiro Sz** Endothelial relaxation mechanisms and nitrate stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. *LIFE SCIENCES* 93:(4) pp. 133-138. (2013) IF:2,296
24. **Varbiro S**, Sara L, Antal P, Monori-Kiss A, Tokes AM, Monos E, Benko R, Csibi N, Szekeres M, Tarszabo R, Novak A, Paragi P, Nádasy GL. Lower-limb veins are thicker and vascular reactivity is decreased in a rat PCOS model: concomitant vitamin D3 treatment

partially prevents these changes AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 307:(6) pp. H848-H857. (2014) IF:3,838

25. Matrai M, Hetthessy JR, Nadasy GL, Szekacs B, Mericli M, Acs N, Monos E, Arbib N, **Varbiro S** Estrogen therapy may counterbalance eutrophic remodeling of coronary arteries and increase bradykinin relaxation in a rat model of menopausal hypertension. MENOPAUSE 23:(7) pp. 778-783. (2016) IF:2,733

26. Hadjadj L, **Varbiro S**, Horvath EM, Monori-Kiss A, Pal E, Karvaly GB, Heinzlmann A, Magyar A, Szabo I, Sziva RE, Benyo Z, Buday M, Nadasy GL Insulin resistance in an animal model of polycystic ovary disease is aggravated by vitamin D deficiency: Vascular consequences. DIABETES & VASCULAR DISEASE RESEARCH 15(4): 294-301. (2018) IF:2.357

8.3. A disszertációban idézett saját közlemények a témában

27. Bekesi G, Kakucs R, **Varbiro S**, Feher J, Pazmany T, Magyar Z, Sprintz D, Szekacs B. Induced myeloperoxidase activity and related superoxide inhibition during hormone replacement therapy. BJOG. 2001;108:474-481. IF: 2,321

28. Bekesi G, Kakucs R, Sandor J, Sarvary E, Kocsis I, Sprintz D, **Varbiro S**, Magyar Z, Hrabak A, Feher J, Szekacs B. Plasma concentration of myeloperoxidase enzyme in pre-and postclimacterial people. Related superoxide anion generation. Exp Gerontol. 2001; 37:137-148. IF: 2,493

29. Bekesi G, Racz K, Hrabak A, Kakucs R, **Varbiro S**, Magyar Z, Feher J, Dinya E, Pazmany T, Paku S, Szekacs B. Systematic investigation of different steroid precursors with respect to their effect on superoxide anion production by human neutrophil granulocytes. Horm Metab Res. 2004; 36:155-163. IF: 1,946

30. Szelke E, **Varbiro S**, Mersich, T, Banhidy F, Szekacs B, Sandor P, Komjati K. Effects of Estrogen and Progestin on Hypothalamic Blood Flow Autoregulation. J Soc Gynecol Investig. 2005; 12: 604–609. IF: 2,887

31. Szelke E, Mersich T, Szekacs B, Sándor P, Komjáti K, **Varbiro S**. Effects of estrogen and progestin on CO₂-sensitivity of hemispherical cerebral blood volume Menopause, 2008; IF: 3,452

32. M Matrai, B Szekacs, M Mericli, GL Nadasy, M Szekeres, G Bekesi, E Monos, **Sz Varbiro**. Biomechanics and vasoreactivity of female intramural coronaries in angiotensin II induced hypertension. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010; 97:31–42. IF: 1,226
33. Takacs I, Benko I, Toldy E, Wikonkal N, Szekeres L, Bodolay E, Kiss E, Jambrik Z, Szabo B, Merkely B, Valkusz Z, Kovacs T, Szabo A, Grigoreff O, Nagy Z, Demeter J, Horvath HC, Bittner N, **Varbiro S**, Lakatos P. Hazai konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében. *ORVOSI HETILAP* 153:(Suppl.2.) pp. 5-26. (2012)
34. Pludowski, P ; Karczmarewicz, E ; Bayer, M ; Carter, G ; Chlebna-Sokół, D ; Czech-Kowalska, J ; Dębski, R ; Decsi, T ; Dobrzańska, A ; Franek, E, **Várbiro S**. et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency *ENDOKRYNOLOGIA POLSKA* 64 : 4 pp. 319-327. , 9 p. (2013) IF:1,208
35. Pludowski P , Grant WB , Bhattoa HP , Bayer M , Povoroznyuk V , Rudenka E , Ramanau H , **Varbiro S**, Rudenka A , Karczmarewicz E , Lorenc R , Czech-Kowalska J , Konstantynowicz J Vitamin D Status in Central Europe *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY* 2014: Paper 589587. 12 p. (2014) IF: 1,948
36. Stark J, **Varbiro S**, Sipos M, Tulassay Z, Sara L, Adler I, Dinya E, Magyar Z, Szekacs B, Marczell I, Kloosterboer HJ, Racz K, Bekesi G Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone *GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY* 31:(1) pp. 31-35. (2015) IF: 1,413
37. Pal E, Hadjadj L, Fontanyi Z, Monori-Kiss A, Mezei Z, Lippai N, Magyar A, Heinzlmann A, Karvaly G, Monos E, Nadasy G, Benyo Z, **Varbiro S** Vitamin D deficiency causes inward hypertrophic remodeling and alters vascular reactivity of rat cerebral arterioles. *PLOS ONE* 13:(2) Paper e0192480. 16 p. (2018) IF:2,776
38. Hadjadj L; Pál É; Monori-Kiss A; Sziva, RE; Korsós-Novák Á; Horváth EM; Benkő R; Magyar A; Magyar P; Benyó Z, Nádasz GL, **Várbiro S**. Vitamin D deficiency and androgen excess result eutrophic remodeling and reduced myogenic adaptation in small cerebral arterioles in female rats *GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY* pp. 1-6. , 6 p. (2019) IF: *1,406

39. Hadjadj L; Monori-Kiss A; Horváth EM; Heinzlmann A; Magyar A; Sziva RE; Miklós, Zs; Pál É; Gál J; Szabó, I, Benyó Z., Nádasy GL, **Várbíró S.** Geometric, elastic and contractile-relaxation changes in coronary arterioles induced by Vitamin D deficiency in normal and hyperandrogenic female rats MICROVASCULAR RESEARCH 122 pp. 78-84. , 7 p. (2019) IF:*2,604
40. Pal, E*; Hadjadj L*; Fontanyi Z; Monori-Kiss A; Lippai N; Horvath EM; Magyar A; Horvath E; Monos E; Nádasy GL. Benyó Z, **Várbíró S.** Gender, hyperandrogenism and vitamin D deficiency related functional and morphological alterations of rat cerebral arteries PLOS ONE 14 : 5 Paper: e0216951 , 13 p. (2019) IF: *2,776

8.4. Egyéb saját angol nyelvű közlemények listája

41. Tarjan I, Balaton G, Balaton P, **Varbiro S**, Vajo Z. Facial and dental appearance of Williams syndrome. Postgrad Med J. 2003 Apr;79(930):241.
42. Ujvari E, Bernard A, Krizsa F, Paulin F, **Varbiro S** Differential Diagnosis of a Severe Late Onset Ovarian Hyperstimulation Syndrome Associated with Prolonged Ascites Production – a Case Report J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (4), 259-261
43. Ujvari E, Krizsa F, Sebestyen A, **Varbiro S**, Paulin F Successful management of intrauterine twin and concomitant cervical pregnancy: A case report FETAL DIAGNOSIS AND THERAPY 21:(2) 181-184. (2006) IF:0,761
44. Patai K; Illyes G; **Varbiro S**; Gidai J; Kosa L; Vajo Z Uterine leiomyosarcoma with osteoclast like giant cells and long standing systemic symptoms. GYNECOLOGIC ONCOLOGY 102 : (2). 403-405 (2006) IF:2,319
45. Sebestyen A, **Varbiro S**, Sara L, Deak G, Kerkovits L, Szabo I, Kiss I, Paulin F Successful management of pregnancy with nephrotic syndrome due to preexisting membranous glomerulonephritis: a case report. FETAL DIAGNOSIS AND THERAPY 24:(3) pp. 186-189. (2008) IF:1,184
46. **Varbiro S**, Biro A , Cervenak J , Cervenak L , Singh M , Banhidý F , Sebestyen A , Fust G , Prohaszka Z Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 97:(1) pp. 1-10. (2010) IF: 1,226

47. Nádasy GL, **Várbíró S**, Szekeres M, Kocsis A, Székács B, Monos E, Kollai M. Biomechanics of Resistance Artery Wall Remodeling in Angiotensin-II Hypertension and Subsequent Recovery. *Kidney Blood Press Res.* 2010; 33:37-47. IF : 1,500
48. Adler I, Tulassay Z, Stark J, Marczell I, Nagy-Repas P, **Varbiro S**, Magyar Z, Szekacs B, Racz K, Bekesi G. The effect of certain steroid hormones on the expression of genes involved in the metabolism of free radicals. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28:912-916. IF: 1,303
49. Wappler EA, Antal P, **Várbíró S**, Székács B, Simon A, Nagy Z, Monos E, Nádasy GL Network remodeling of intramural coronary resistance arteries in the aged rat: A statistical analysis of geometry. *Mech Ageing Dev.* 2013; 134:307-313. IF:3,510
50. Stark J , Varga Z , Ghidan A , Vajdovich P , Szombath D , Marczell I , **Varbiro S** , Dinya E , Magyar T , Tulassay Z , Szekacs B , Nagy K , Racz K , Bekesi G. The effect of indometacin, myeloperoxidase, and certain steroid hormones on bactericidal activity: an ex vivo and in vivo experimental study. *ANNALS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIALS* 13:(1) Paper 27. 9 p. (2014) IF: 2,189
51. Berczi V , Valcseva E , Kozics D , Kalina I , Kaposi P , Sziller P , **Varbiro S** , Botos EM Safety and Effectiveness of UFE in Fibroids Larger than 10 cm *CARDIOVASCULAR AND INTERVENTIONAL RADIOLOGY* 38:(5) pp. 1152-1156. (2015) IF: 2,144
52. Molnár A, Jónásné Sztruhár I, Csontos ÁA, Ferencz C, **Várbíró S**, Székács B. Special nutrition intervention is required for muscle protective efficacy of physical exercise in elderly people at highest risk of sarcopenia. *Physiol Int.* 2016 Sep;103(3):368-376. IF: 0,571
53. Kalina I; Tóth A; Valcseva É; Kaposi PN; Ács N; **Várbíró S**; Bérczi V Prognostic value of pre-embolisation MRI features of uterine fibroids in uterine artery embolisation. *CLINICAL RADIOLOGY* 73 : 12 pp. 1060.e1-1060.e7. (2018) IF:2.082
54. Nemcsik, János; Páll, Dénes; Ábrahám, György; Barna, István; Benczúr, Béla; Fang Simon; Halmai Richárd; Matoltsy András; Szegedi János; **Várbíró Szabolcs** et al. May Measurement Month 2017: an analysis of blood pressure screening in Hungary—Europe *EUROPEAN HEART JOURNAL SUPPLEMENTS* 21 : Supplement D pp. D56-D58. (2019) IF:*1.321

8.5. A tudományos aktivitás összefoglaló adatai (2019.09.05.):

- **Könyvfejezetek: 4**
- **Közlemények: 73 (54 angol, 19 magyar) – Q1: 28, ebből D1: 12.**
- **Közlemények összesített impakt faktora: 115,229**
- **WOS/ Scopus összes / független idézettség: 811 / 616**
- **Teljes idéző szám 971**
- **Hirsch index (WOS/Scopus alapján): 15**

Köszönetnyilvánítás

Köszönet Mestereimnek...

Prof. Dr. Székács Bélának, aki a klinikum és a kutatás szerves egységére tanított, az individuális orvoslásra, hogy mindig keressem az embert a protokoll mögött, aki persze mindig kicsit más, mint a protokoll. Néhai Prof. Dr. Monos Emilnek, akinek a laboratóriumában nevelkedtem kutatói pályám elején. Szisztematikus gondolkodását és translációs szemléletét most is útravalóként viszem tovább, szeretett emlékével együtt. Dr. Nádasy György Tanár Úrnak, aki közvetlenül irányította labormunkámat és a PhD fokozatszerzést követően is mindig számíthattam támogatására; mind precíz és alapos kutatómódszertani ismeretei, mind fegyelmezett gondolkodása stabil háttérrel nyújtott eddigi pályámon. Szerencsésnek mondhatom magamat, mert orvosi pályám elején olyan aktív kutató-klinikus együttműködésbe cseppentem irányításukkal, mely mindig nyitottan, de kritikusan irányította, de sosem korlátozta a kezdő kutatók, PhD és TDK hallgatók gondolkodását.

Hasonlóan szerencsésnek mondhatom magamat és hálával tartozom eddigi és jelenlegi klinikaigazgatóimnak, Prof. Dr. Paulin Ferencnek, aki lehetőséget adott klinikáján megismerkednem a szülészeti-nőgyógyászati alapjaival, akinek előadásaiból mindig tanultam a szakmát és a szakma tanításának fortélyait. Prof. Dr. Pajor Attilának, aki további szakmai fejlődésemet biztosította, akinek a felügyeletével osztály- és ügyeletvezetővé értem, lehetőséget adott szakmai fejlődésemre: klinikai farmakológia, endokrinológia, hipertoniológia és diabetológia irányú továbbképzésre és szakképesítések elérésére.. Prof. Dr. Bánhidyi Ferencnek és Prof. Dr. Ács Nándornak, akik mindig támogatták további szakmai fejlődésemet, habilitációs és MTA doktori pályázatom kialakítását. Volt és jelen klinikai vezetőim folyamatosan inspirálták tudományos fejlődésemet. Az általuk kialakított vezetői gyakorlat minden beosztottnak biztosította azt, hogy érdeklődési körének megfelelően optimálisan fejleszthesse szakmai és tudományos kutatói képességeit.

Köszönöm korábbi és jelenlegi PhD hallgatóim, Dr. Szelke Emese, Dr. Masszi Gabriella, Dr. Sára Levente, Dr. Mátrai Máté, Dr. Hadjadj Leila, Dr. Pál Éva, Dr. Magyar Péter, Dr. Török Marianna támogatását, a laborban és a cikkírással töltött közös órákat-napokat, melynek eredményeiről ebben az összefoglalóban beszámoltam. Már PhD ösztöndíjas korom elején megtanultam, hogy a tudomány csapatomunka – és ezt a csapatot építeni, gondozni kell. Most már önálló munkacsoportot építve próbálom tovább vinni azt az örökséget és a translációs szemléletet, amit mestereimtől kaptam. És örömmel látom, hogy az irányításommal PhD fokozatot szerzett és szerző kollégáim viszik tovább a lángot, a kutatás lelkesedése Őket is áthatotta, többségük – lehetőségeihez mérten – tovább folytatja a kutató munkát jelenlegi pályája során is. Külön köszönöm jelenleg mellettem dolgozó közvetlen kollégáim Dr. Sziva

Réka Eszter, Dr. Gerszi Dóra és Bányai Bálint oh. támogatását, hogy a napi munka mellett a disszertáció egységes ábra-szettjének kialakításában, szerkesztésében, korrektúrájában is számíthattam segítségükre. Köszönöm fiatal klinikus kutató kollégáim; Dr. Bakos Marcell, Dr. Jósvai Attila, Dr. Korsós-Novák Ágnes, Dr. Lajtai Krisztina, Dr. Merkely Petra, Dr. Süli Anita, Dr. Tarszabó Róbert, Dr. Vezér Márton lelkes érdeklődését, akik a napi gyógyító munka mellett a kutatásban is helytállnak, valamint külön köszönetem TDK hallgatóimnak is.

Köszönöm a közös kutatás, tudományos munka lehetőségét Prof. Dr. Benyó Zoltánnak, Prof. Dr. Hunyady Lászlónak, Prof. Dr. Hamar Péternek, Dr. Békési Gábor egyetemi docensnek, Dr. Horváth Eszter Mária egyetemi adjunktusnak, Prof. Dr. Pawel Pludowski-nak és munkacsoportjaiknak. Köszönöm a sok éven át nyújtott asszisztensi segítségét Oraveczné Murányi Ildikónak.

És végül, de mindenek felett köszönöm Édesanyámnak, Várbíró Szabolcsné-nak, hogy mindig szeretettel és odaadással segített pályám során. Szakmai igényessége, etikussága és emberszeretete mindig példaként állt előttem.

Budapest, 2019.09.05.

dr. Várbíró Szabolcs