

A vaszkuláris reaktivitás változásai és a D₃-vitamin hatása policisztás ovárium szindróma patkány modelljében

Doktori értekezés

Dr. Masszi Gabriella

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Várbíró Szabolcs egyetemi adjunktus PhD
- Hivatalos bírálók: Dr. med. habil. Járai Zoltán osztályvezető főorvos PhD,
med. habil.
Dr. Mózes Miklós egyetemi adjunktus PhD
- Szigorlati biz. elnöke: Prof. Dr. Rosivall László intézetvezető egyetemi tanár
PhD, MTA doktora
- Szigorlati biz. tagjai: Dr. Farkas Katalin osztályvezető főorvos PhD
Dr. Ujházy András egyetemi adjunktus PhD

Budapest

2012

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés	7
3.1. Előszó.....	7
3.2. Epidemiológia és patogenezis.....	8
3.2.1. Inszulin rezisztencia-hiperinzulínémia eredet	10
3.2.2. Hiperandrogenémia	16
3.2.3. Hipotalamusz-hipofízis-petefészek tengely	19
3.2.4. Genetikai prediszpozíció.....	20
3.3. A PCOS metabolikus jellemzői	20
3.4. Kardiovaszkuláris veszélyeztetettség.....	22
3.5. Vaszkuláris változások PCOS-ben	24
3.6. A D-vitamin hatásai PCO szindrómában.....	26
3.7. A PCOS modellek.....	27
3.8. A szexuál szteroidok hatása a kardiovaszkuláris rendszerre	28
3.8.1. A nemi hormonok direkt szív és érrendszeri hatásai	29
3.8.2. Ösztrogén hatások	29
3.8.3. A nemi hormonok arterioszklerózisra gyakorolt hatása.....	30
3.9. A PARP jelentősége a sejtek működésében	31
4. Célkitűzések	33
5. Módszerek	34
6. Eredmények.....	42

7. Megbeszélés	56
7.1. Inzulin	56
7.2. D-vitamin	60
7.3. Vazoreaktivitás	61
7.3.1 Noradrenalinral kiváltott kontrakciók	61
7.3.2. Ach Relaxáció	63
7.4. Ösztrogén	66
7.4.1. Az ösztradiol relaxáló hatása	66
7.4.2. A tesztoszteron hatása	68
7.5. PARP aktivitás	69
8. Következtetések, saját kutatási eredmények összefoglalása	72
9. Összefoglalás	74
10. Summary	75
11. Irodalomjegyzék	76
12. Saját irodalomjegyzék	102
12.1. A disszertáció témájában megjelent első szerzős közlemények	102
12.2. A disszertáció témájában megjelent társszerzős közlemények	102
12.3. Nem a disszertáció témájában megjelent közlemények	103
13. Köszönetnyilvánítás	104

2. Rövidítések jegyzéke

ABPM	ambulatory blood pressure monitoring (ambuláns vérnyomás ellenőrzés)
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
ACh	acetilkolin
ACTH	adrenokortikotrop-hormon
AGIIR1	angiotenzin II 1-es típusú receptora
AMPK	adenozin monofoszfát kináz
ANOVA	analysis of variance (variancia analízis)
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
BMI	body mass index (testtömeg index)
CAH	kongenitális adrenális hiperplázia
cAMP	ciklikus adenzin- monofoszfát
c-NOS	konstitutív nitrogénoxid szintáz
cs.	csoport
CRH	kortikotrop releasing hormon
CYP	citokróm P enzimcsoport
DAB	diaminobenzidin
DHEA	dehidroepiandroszteron
DHT	dihidrotesztozteron
D ₃ -vitamin	1-25(OH) ₂ D ₃ vitamin
DMII	2-es típusú diabétesz mellitusz
DNS	deoxiribonukleinsav
E ₂	ösztradiol
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
e-NOS	endoteliális nitrogénoxid szintáz
ESHRE	European Society for Human Reprouction and Embriology
FMD	flow mediated dilatation (áramlás indukálta dilatáció)
FSH	follikulus stimuláló hormon
GnRH	gonadotrop releasing hormon

HA	hiperandrogén
HAIRAN	Hyper Androgen Insulin Resistant Acanthosis Nigricans
HE	haematoxylin- eosin
HERS	Heart and Estrogen/progestin Replacement Study
HOMA-IR	homeostatic assessments – insulin resistance (az inzulin rezisztencia homeosztatikus modellje)
IGF	insulin like growth factor (inzulinszerű növekedési faktor)
IGFBP	insulin like growth factor binding protein (inzulinszerű növekedési faktor kötő fehérje)
IGT	impaired glucose tolerance (csökkent glukóz tolerancia)
i.m.	intramuszkuláris
IMT	intima media thickness (intima média vastagság)
i-NOS	indukálható nitrogénoxid szintáz
INZR	inzulin receptor alfa kötőhelye
IR	inzulin rezisztencia
IRS-1	inzulin receptor szubsztrát fehérje-1
LH	luteinizáló hormon
L-NAME-L-N ^G	nitro arginin-metil-észter-hidroklorid
mN	milliNewton
NA	noradrenalin
NE	nemzetközi egység
NIH	National Institutes of Health
NO	nitrogénoxid
nKR	normál Krebs-Ringer
n.s.	nem szignifikáns
OGTT	oral glucose tolerance test, terheléses vércukormérés
PAR	poli-ADP-ribóz
PARP	poli-ADP-ribóz polimeráz
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PCOS	policisztás ovárium szindróma
POF	primer ovarian failure (elsődleges petefészek elégtelenség)
PWV	pulse wave velocity (pulzushullám terjedési sebesség)

RIA	radioimmunoassay
SHBG	sexual hormone binding globulin (szexuálhormon kötő fehérje)
SHHF	spontan hypertensive heart failure (spontán hipertenzív szívelégtelenség)
TA	torakális aorta
TX2	tromboxán A2
vs.	versus

3. Bevezetés

3.1. Előszó

A policisztás ovárium szindróma első neve a Stein-Leventhal szindróma volt, két chicagói nőgyógyász vezetéknevéből alkotva, akik több olyan esetről számoltak be 1935-ben, amelyekben a terméketlenség mellett fokozott szőrnövekedést, rendszertelen havi vérzést és megnagyobbodott petefészkeket találtak (Stein 1935). Név nélkül azonban már jóval korábban is leírták; már az 1700-as évek elején egy olasz polihisztor, bizonyos Antonioni Vallisneri is ezt a kórképet jellemezte, amikor beszámolt egy kövér, terméketlen parasztasszonyról, akinek a petefészkei nagyobbak, fehérnek és dudorosnak találta.

A PCOS jóval gyakrabban fennáll, mint azt diagnosztizálják, ám az ismert esetek alapján is a nők legalább 5-8%-át érinti. Igazi interdiszciplináris probléma; nőgyógyász, belgyógyász, endokrinológus, pszichológus, pszichiáter, sőt bőrgyógyász is találkozhat vele. Rendszerbetegség, amely egy életen keresztül elkíséri a beteget, és más-más korban más-más problémákat vet fel. A PCOS-ben szenvedő nők szív és érrendszeri rizikója már fiatal felnőtt korban fokozott, és ez a rizikó többlet egész életen keresztül fennmarad. A hiperandrogenémia és az inzulin rezisztencia mellett hipertónia, csökkent glukóz tolerancia, kedvezőtlen vérzsír szintek, majd diabétesz mellitus alakulhat ki, ezek minden szervet, és az érrendszert is érintő következményeivel. Az érrendszer, a fő verőér rugalmassága csökkenhet, és a kórélettani változások klinikai események felléptét siettethetik. A PCOS gyógyítása jelenlegi tudásunk szerint nem lehetséges, csak kezelni tudjuk az elváltozásokat, a hormonális és metabolikus eltéréseket. A D₃-vitamin kiegészítő terápiás lehetőség a betegség gyógyításában, azonban az élettani hatásai csak részben tisztázottak. A D₃-vitaminról tudjuk, hogy az inzulin szenzitivitást javítja és az ovarialis follikulogenezist is serkenti, de nem ismerjük az érfali rugalmasságra és válaszkészségre gyakorolt hatását.

A PCOS kóroktani eredete, és abban az érrendszeri elváltozások kórélettani folyamatai még mindig nem teljesen tisztázottak annak ellenére, hogy betegség sokakat érint, ezért vállalkoztunk erre a kísérletsorozatra, amelyben először a PCOS-t modelláltuk Wistar

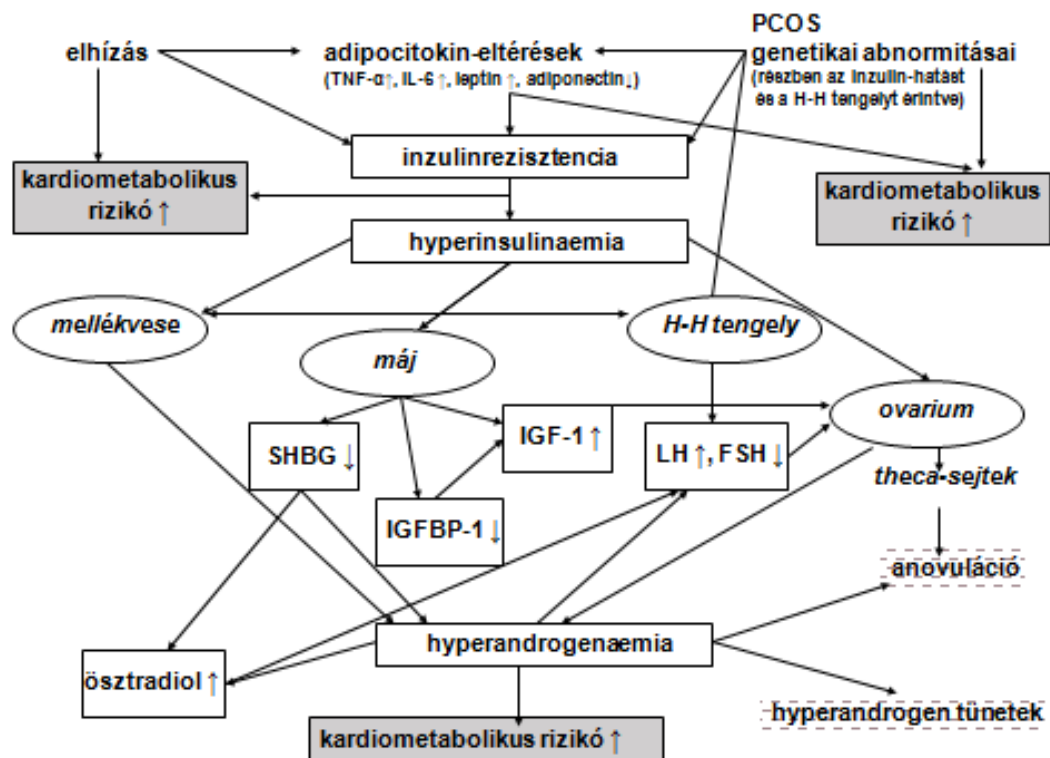
patkányokon. A sikeres modellálást követően a fő verőér, az aorta farmakológiai válaszkészségét vizsgáltuk vazokonstriktor, vazodilátor hatásokra. Megvizsgáltuk az inzulinra, ösztrogénre adott relaxációs válaszokat, és a sejtkárosodás mértékét is. Mindezekben kerestük a D₃-vitamin hatását, hogy a D₃-vitamin PCOS-ben gyakorolt terápiás effektusának további részleteire derítsünk fényt.

3.2. Epidemiológia és patogenezis

A policisztás ovárium szindróma a fertilis korú nők körülbelül 5-8%-ában fordul elő (Solomon 1999, Asuncion 2000, Azziz 2004, Hart 2004), a magyar társadalomban ez körülbelül 500 000 nőt jelent. Igen gyakori, mondhatjuk a diabétesz mellitusz után a leggyakoribb endokrin betegség hazánkban. Nagy valószínűséggel még ennél is magasabb a prevalenciája, azonban aluldiagnosztizáltság miatt sok eset nem is kerül felismerésre (Broekmans 2006). Az újabb diagnosztikus kritériumok alkalmazásával történő besoroláskor a prevalencia akár 18%-ra is nőhet (March 2010). A probléma relevanciáját jelzi, hogy a nők terméketlenségéért 50-60%-ban ez a kórkép felelős, az anovuláció leggyakoribb oka is egyben. Továbbá minden tizedik beteg 40 éves korára diabéteszes lesz és a PCOS-es hölgyek 30-40%-ban IGT-t, csökkent glukóz toleranciát is lehet diagnosztizálni (Speer 2009). A PCOS hosszú távon növeli a kardiovaszkuláris rizikót (Talbot 2004, Dokras 2008, Puurunen 2011, deGroot 2012), és bizonyos tumorok megjelenési valószínűségét fokozza (Pillay 2006). A folyamat kóreltani háttere még nem teljesen tisztázott, maradtak még feltáratlan területek az etiopatogenezisben. Az alapvető mechanizmus a hormonális diszfunkció, amely hiperandrogenémiával és hiperinzulinémiával jár. A hormonháztartás zavarához genetikai és környezeti predisponáló tényezők vezethetnek. Ezek, és a hipofízis működésbeli eltérései más kiegészítő faktorokkal: obezitás, és a petefészkek diszfunkciója, mindezek együtt képezik a PCOS etiológiai hátterét (Legro 2002). Leggyakoribb jellemzői úgy mint a hiperandrogenémia (60-80%) és az inzulin rezisztencia (50-70%) a betegek több mint felében megtalálhatóak. Az inzulin rezisztencia hozzájárul a tüneteket okozó és fenntartó hiperandrogenémiához, és a hiperandrogenémia az inzulin rezisztencia fennmaradását segíti elő (Legro 2004). Az inzulin rezisztencia és hiperinzulinémia nemcsak metabolikus elváltozásokat okoz, de a

reproduktív funkcióra is kedvezőtlenül hat, mivel az androgének termelését, és a szabad androgének mennyiségét is növeli az SHBG szint csökkentésén keresztül (Diamanti-Kandarakis 2006). Az etiológia és a klinikai tünetek vázlatos összefüggését láthatjuk az 1. ábrán.

1. ábra: A PCOS etiológiája és klinikai jellemzőinek vázlatos összefüggései



Lakatos P, Speer G. Policisztás Ovárium Szindróma. Budapest. Semmelweis Kiadó, 2009: 43 nyomán.

Az obezitás részben tünete, de egyben oka is a betegségnek, mert az elhízás a hiperandrogenémiát, a hirsutizmust és a terméketlenséget is fokozza (Kiddy 1990). A túlsúly ugyanis a PCOS-ben, és attól függetlenül is metabolikus szindrómára, hipertóniára és inzulin rezisztenciára hajlamosít. A soványabb PCOS-es betegeknek mérsékelt fokú a hiperinzulinémiája és az inzulin rezisztenciája is (Moran 2009). Sokáig a patomechanizmus elsődleges lépcsőfokának az elhízást és az inzulinrezisztenciát gondolták, és a hiperandrogenémiát tartották másodlagosnak, de ma már általánosan elfogadottabb az az elképzelés, hogy az androgén túlsúly az elsődleges

tényező (Aziz 2006). Klinikai vizsgálatokkal igazolták, hogy amikor nemváltást szeretne elérni valaki valamilyen okból, így például nőből férfiúvá akar válni, akkor a hím nemi hormon adagolás hatására obezitás és inzulinrezisztencia alakul ki (McCredie 1998, Speer 2009). A kóroktani eredet máig sem tisztázott pontosan, több azonos hangsúllyal szereplő elképzelést ismerünk, úgy mint inzulin rezisztencia, vagy hiperandrogenémia eredet, a hipotalamusz hipofízis ovárium tengely működésének zavara, vagy a mellékvesekéregben elsődlegesen kialakuló androgén túlsúly teóriája (Tsilchorozidou 2004, Speer 2009, Valkusz 2010, Mukherjee 2010). Mindezek ma még nem egyesíthetők koherens patológiai kórképbe (Hughes 2006, Valkusz 2010, Jasti 2012). Ezen kívül felmerül még a magzati időszakban elszenvedett androgén excessus szerepe is (Xita 2006), amely logikus feltételezés, de kellő mennyiségű bizonyíték nem áll rendelkezésre erre vonatkozóan sem (Nisenblat 2009).

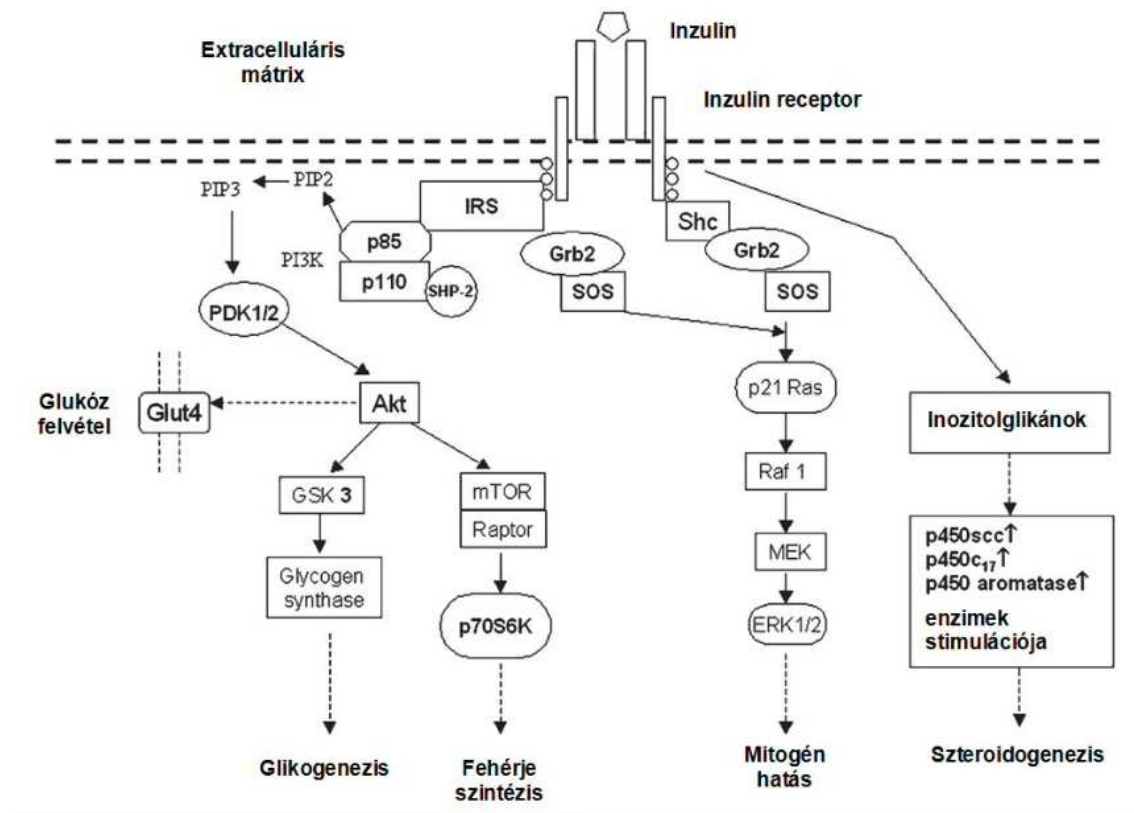
3.2.1. Inzulin rezisztencia-hiperinzulinémia eredet

Az inzulin hormon a test különböző szervein sokrétű (pleiotrop) hatást fejthet ki különböző jelátviteli utak igénybevételével. A petefészkekben az androgén szintézis növelését idézi elő közvetlenül, és az LH hormon hatására létrejövő szteroidogenezist is augmentálhatja (Poretsky 1999). A májban termelődő SHBG szintézis csökkentését válthatja ki, amely a biológiailag aktív tesztoszteron szintjének meghatározó faktora. Ezen kívül az IGFB fehérje szintézisét csökkenti a májban és az ováriumban is, aminek következtében a szabad IGF-1 szint és a következményes GnR hormon stimulált LH elválasztás fokozódik (Bremer 2008, Mukherjee 2010).

A hiperandrogenémia és inzulin rezisztencia közös jelenléte, és a szindróma két fő jellegzetessége az IRS1-en kialakuló szerin foszforiláció hipotézisével könnyen és jól magyarázható (Dunaif 1995, Zhang 1995, Speer 2009, Valkusz 2010). Ennek lényege az inzulin sejt receptorához való kötődését követően létrejövő többlépcsős mechanizmus egyik lépcsőfokában beálló meghibásodás. A hiba következtében a jelátviteli út az inzulin hatásának csökkenéséhez, (inzulin rezisztencia), és az androgén szintézis fokozódásához (hiperandrogenémia) vezet. Az inzulin receptor sejten belüli béta alegysége az inzulin kötődése (sejten kívüli alfa alegység) hatására autofoszforilálódik, ez a folyamat tirozin kinázt aktivizál, amelynek normális működése

kell ahhoz, hogy a glukóz sejtbe irányuló transzportja megtörténhessen (2 ábra). Az inzulin jelátviteli celluláris mechanizmusait már igen sok részletében feltárták (Mukherjee 2010). Amint a hormon az extracelluláris receptor részlethez INZR (inzulin receptor alfa alegység) kötődött, az inzulin intrinzik tirozin kináz aktivációt és autofoszforilációt indít be a receptor béta alegységén. Az inzulin receptor alfa alegysége további számos fontos szubsztrátot foszforilál; így például az inzulin receptor szubsztrát családot (IRS1-4), Gab-1, Cbl, APS és Shc izoformokat és a szignált szabályozó fehérje család (SIRP-signal regulatory protein) tagjait, amelyek az inzulin receptorhoz (INZR) kötődnek (Pessin 2000). A foszforilált IRSF-ek (inzulin receptor szubsztrát fehérjék) átkapcsolóhelyként szolgálnak további sejten belüli fehérjéknek; a Grb2, NcK és a foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K) 85p jelű regulációs alegysége számára, amelyek az inzulin különböző szignáltranszdukcióinak közvetítői. A PI3K aktivációja a metabolikus út továbbviteléhez szükséges, amennyiben a GLUT4 transzlokációért és a glukóz sejtbe juttatásáért, glikogén szintéziséért és fehérjék szintéziséért is felel. A GLUT4 transzlokációja az Akt fehérje AS160 jelölésű szubsztrátja hatására a sejtől a plazma membránjára kerül, amivel egyidejűleg a glukóz gyorsan beáramlik a sejtbe (Hoiland 2008). A mitogén hatásokat a Grb2/SOS komplex aktiválása által a p2RAS és Raf-1aktivációján keresztül a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) működése indíthatja be, melyet a PI3K valószínűleg facilitál (Venkatesan 2001).

2. ábra: Az inzulin receptor fiziológias jelátviteli működésének vázlatos rajza (Mukherjee nyomán módosítva)

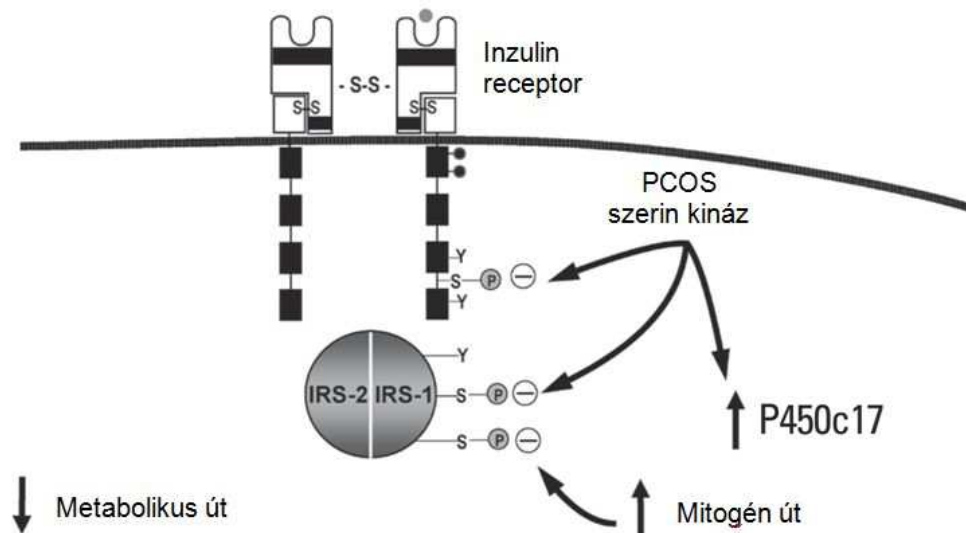


Rövidítések: PIP2- foszfatidilinozitol4,5 bifoszfát, PIP3- foszfatidilinozitol3,4,5-trifoszfát, mTOR- mammalian target of rapamycin, Raptor-regulatory associated protein of mTOR, Glut4-4-es glukóz transzporter, GSK-3- glikogén szintáz kináz, PDK1/2- foszfoinozítid dependens kináz 1/2, p70S6K- riboszomális fehérje S6 kináz, MEK-mitogén aktivált protein kináz kináz, ERK1/2- extracelluláris szignál szabályozott kináz1/2, SHP-2- SH₂-domént tartalmazó tirozín foszfatáz.

Az inzulin az inzulin receptor alfa részhez kötődve autofoszforilációt és tirozín kináz aktivációt eredményez a receptor béta alegységén, ami már a sejten belül található, és ami további mediátorok – IRS (inzulin receptor szubsztrát) és Shc (Src homolog domént tartalmazó transzformáló 2-es fehérje) foszforilációját hozza létre. Ezek a mediátorok aztán a sejten belül különböző utakat aktiválhatnak, további fehérjék szignalizációjával. A foszfatidil inozitol 3 kináz (PI3K) aktivációs út a glukóz transzportban, glikogenezisben és fehérje szintézisben játszik döntő szerepet. Másrésről a Grb2/SOS (a növekedési faktor által kötött 2-es receptor / son of sevenless) komplex a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) aktiválásával a mitogén válaszok kialakításáért felel. Egy újabb jelátviteli út az inozitol glikánokon keresztül aktiválódik, amely a szteroidogenezisben ható enzimek stimulációját okozza.

Az autofoszforiláció azonban gyakorta (PCOS-es nőkben igen gyakran) nem a tirozin, hanem a szerin oldalláncon megy végbe a proteinkináz C hatására és így a tirozin kináz aktivitása nem növekszik, hanem csökken (3. ábra). Az inzulin szignáltranszdukciós hibát PCOS-es nők vázizomzatából származó biopsziás anyag miofilamentumain is ki lehetett mutatni csökkent PI3K és IRS-1 aktivitással (Corbould 2005). Csakúgy, mint azt (Dunaif 2001) PCOS-ben szenvedő nőknél végzett in vivo euglikémiás hiperinzulinémiás klamp vizsgálattal egybekötött vázizom biopszia vizsgálata alkalmával találta. Az IRS-1 mediálta PI3K aktivitás az IRS-1 (inzulin receptor szubsztrát-1) 312-es szerin foszforilációjának növekedésével jár együtt, ez a PCOS-es miofilamentumok jelátviteli reguláló helyének bizonyult (Corbould 2005). Ezek a vizsgálati eredmények igazolják azt a feltételezést, hogy az IRS-1 fokozott szerin foszforilációja az inzulin rezisztencia kialakulását segíti elő egy, a cukor felvétel egyik legfontosabb célszervén, a vázizomzaton (Dunaif 2001, Corbould 2005).

3. ábra: Az inzulin receptor vázlatos működése PCOS-ben



Jasti P, Dunaif A. (2012) *Reproduction and Metabolism: Insights from Polycystic Ovary Syndrome* *Endocrinol Metab* 27(3):180-190 nyomán

Az inzulin receptor kötődési mechanizmusában bekövetkező jelátviteli hiba az, ami az inzulin rezisztencia kialakulásának egyik fő oka. Ennek következménye az *inzulin rezisztencia*, vagyis, hogy bizonyos mennyiségű inzulin jelenlétében kevesebb glukóz jut be a sejtbe, másként több inzulinra van szükség azonos mennyiségű glukóz sejtbe juttatásához. Dunaif a PCOS-ben az inzulin rezisztencia jellemző megjelenési pontjain, szövettanilag, bőr fibroblaszt sejtenyészeten és vázizom sejtenyészeten mutatta ki az inzulin receptor erősen fokozott szerin foszforilációját (Dunaif 2005). Történetesen a szerin foszforiláció az androgén szintézisben szerepet játszó citokróm P450c17-alfa enzimet is aktiválja és ennek következménye pedig a 17,20-liáz enzim működésének fokozódása, ami közvetlenül az androgén szintézis növekedéséhez, *hiperandrogenémiához* vezet. A szerin foszforiláció következtében kialakult citokróm P450c17-alfa és 17,20-liáz enzim közös aktivitását humán embrionális mikroszomális adrenális sejteken igazolta Zhang kutatócsoportja (Zhang 1995). Ezen enzimek aktivitás fokozásáért közösen az IRS1 szerin foszforilációja a felelős. Az inzulin receptor szubsztrát-1 esetében kimutatták, hogy két aminosav polimorfizmusa az alanin prolinal, vagy glicin argininnal történt helyettesítése megváltoztatja az inzulin hatását és mérhető csökkenés mutatható ki az inzulin dependens tirozin kináz foszforilációban (Somogyi 2000). Ugyanakkor a szerin foszforiláció fokozódik és az inzulin hatása csökken.

A szerin molekulák foszforilációjában az AMPK (cAMP által aktivált protein kináz) enzimnek is szerepet tulajdonítanak, amely a sejtek energiaszintjének állandóságáért is felel (Hardie 2003). Egyes szerzők szerint az AMPK, az étvágy szabályozásában is központi szerepet tölt be (Minokoshi 2004, Andersson 2004). Igen érdekes, hogy a PCOS kezelésében alappillérként használt metformin hatásspektrumába az AMPK működésének serkentése is beletartozik (Zhou 2001). Egy másik, az inzulinérzékenységet fokozó gyógyszer csoport az inzulin rezisztencia kezelésére és a PCOS terápiájára is használt tiazolidindionok, röviden a gliptinek szintén aktiválják az AMPK enzimet (Saha 2004).

Az inzulin háztartás számos, a policisztás ovárium szindrómára jellemző eltérést írtak le: a béta sejtek diszfunkcióját (O'Meara 1993), a hasnyálmirigyben történő csökkent inzulin elválasztást (Dunaif 1996), a hepatikus glukoneogenezis gátlásának gyengülését (Dunaif 1989), és az inzulin receptorok jelátviteli hibáit (Dunaif 1997). Az inzulinnak a

már jól ismert hepatikus, zsírszöveti és izomszöveti aktivitásán kívül számos egyéb célszervi funkciója is van, elsősorban az ováriumban, a hipofízisben és a mellékvesekéregben. Az ováriumok szintjén az inzulin a saját receptorain és az IGF1 receptorokon a téka, a stroma és a granulóza sejtekre is hat (Poretsky 1999).

Az inzulin az ovarialis granulóza és téka sejtekben a szteroidogenezist stimulálja. Valójában a 17 alfa-hidroxiáz és a 17,20-liáz enzimek (mindkettő a CYP450c17-alfa rendszer tagja) aktivitását fokozza (Nestler 1996), és a 3-béta hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitást serkenti (McGee 1995). Az inzulin ugyanakkor fokozza a hipofízis trophormonjainak érzékenységét a GnRH hormonra, és az ováriumokon az LH receptorok számának növelésével fokozza az ováriumok szteroidogénikus válaszkésztségét (Poretsky 1999).

Az inzulin mindezekén túl képes az SHBG hepatikus szintézisének gátlására (Plymate 1988), és mind a májban, mind az ováriumokban az IGFBP-1nek,-az IGF-kötő fehérjéjének-szintézis gátlására, amely a szexuáliszteroidok és az IGF kötésére alkalmas (Poretsky 1996). Mindezek alapján, és tudva azt, hogy PCOS-ben a nők több mint 60%-ában van inzulin rezisztencia és hiperinzulinémia, az inzulin kóroktani szerepe elvitathatatlan és alapvetőnek látszik.

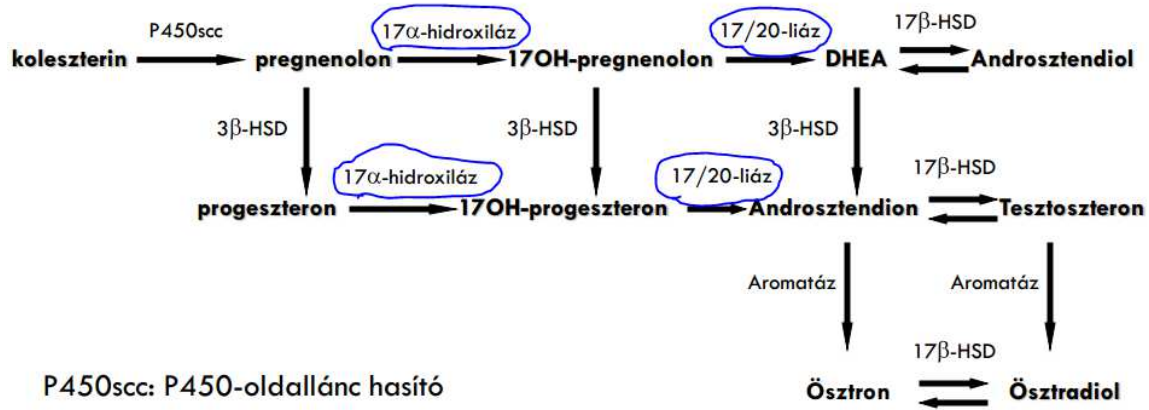
Az inzulin posztreceptorális szignáltranszdukciós eltérése, azaz a tirozin helyett szerin foszforilációs molekuláris működési hiba (Dunaif 1997) a policisztás ovárium szindrómában szenvedő nők több mint 50%-ában kimutatható, és a tirozin kináz aktivitásának a csökkenéséhez vezet. Emellett az inzulin gén, és az inzulin receptor szubsztrát-1 fehérje (IRS-1) gének mutációja, amelyek szintén olyan fehérjék amelyek foszforilációja a tirozin kináz receptor működésén keresztül meg végbe (Ciaraldi 1992) szintén az aktivitás csökkenését fogja előidézni. A sejtek adenzin depléciója (Ciaraldi 1997), vagy a PPAR-gamma (peroxisoma proliferator activator receptor gamma) csökkent értékű működése (Ehrmann 1997), vagy a kötődés után létrejött bármely egyéb hiba, ami a glukóz transzportot károsítja, mind-mind hasonló hatást vált ki. A perifériás inzulin rezisztencia következtében és annak mértékében, kompenzáció céljából a hasnyálmirigy fokozott inzulin elválasztással reagál, így alakul ki a hiperinzulinémia (Holte 1994). Az inzulin rezisztenciától függetlenül egyes munkacsoportok (Holte 1996, Buffington 1994) ismertettek inzulin szekréciós, és

clearance-beli eltéréseket PCOS szindrómában szenvedő nőkben. E mechanizmusok közreműködésével a hiperinzulinémia tovább fokozódhat.

3.2.2. Hiperandrogenémia

PCOS-ben az androgén túltermelés nagyobb része az ováriumból fakad, de az adrenális hormonszintézis is zavart szenved. A PCOS-es betegek 25%-nál mellékvese eredetű hiperandrogenizmus is észlelhető melynek az ovariális tengellyel összekötő eleme a citokróm P450c17-alfa enzim fokozott működése (Bremer 2010, Yildiz 2007). A CYP 17 gén promoter régiójának egyszeres bázis cseréjében ennek genetikai predispozícióját is kimutatták (Frank 1996). A későbbiekben a PCOS etiológiájával összefüggésben több gén eltérését mutatták ki. A CYP17 mellett a CYP11A és a CYP21 gén expressziójának fokozódása is igazolást nyert (Nagamani 2012), de a kór eredetét illetően egyik sem bizonyult kizárólagosnak. A hiperandrogenémia keletkezésének egyik sarkalatos tényezője tehát a P450c17 enzim szabályozásában lelhető fel. Számos hormonról és növekedési faktorról derült ki, hogy reguláló faktora annak a rendszernek, amely a CYP450c17 enzim akár petefészekbeli, vagy mellékvesekéregbeli génjének az expresszáldásában és aktiválódásában szerepet játszhat, úgy mint az inzulin, az LH, az ACTH és az IGF-ek (Rosenfield 1999). A PCOS-ben szenvedő betegek döntő többségében a citokróm P450 c17 enzim fokozott működése vezet az ovariális androgén túltermeléshez (4. ábra).

4. ábra: A szteroid szintézis ováriumban, PCOS-ben



P450_{scc}: P450-oldallánc hasító

17β-HSD: 17β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz

3β-HSD: 3β-hidroxiszteroid-dehidrogenáz

P450c17α: 17α-hidroxiáz és 17/20-liáz

Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. (2004) The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol (Oxf), 60(1): 4. oldal nyomán.

Ennek következtében az androgén termelődés két enzimátikus lépésben is a fokozódás irányába tolódik el, mivel a citokróm P450c17-alfa enzim a 17-alfa-hidroxiáz és a 17,20-liáz enzimek működését egyaránt serkenti. Hogy ez az enzimátikus túlprodukción elsődleges tényező, vagy centrális, esetleg perifériás okok hatására másodlagosan jön-e létre, jelenleg még nem tisztázott. Az emelkedett LH szint stromatizálódáshoz és ciszták kialakulásához vezet, míg az IGF-ek közvetlenül az androgén petefészekben belüli termelődését segítik elő. Az IGF-1 és IGF-2 saját receptorán keresztül hat az ováriumokon. Az ovárium mindhárom rétegében, téka, stroma és a granulóza sejteken is található IGF receptorok (Voutilainen 1996). Az IGF-ek az ovarialis progesztéron termelődést és az ösztradiol elválasztást serkentik, ugyanakkor az aromatóz enzim aktivitását pedig növelik (Poretsky 1999). Ezek a hatások in vitro az androgén szintézis fokozódását idézik elő mind a granulóza, mind a téka sejtekben (Nahum 1995). Az IGF receptorok aktivitása az IGFB proteáz enzim működésének serkentésével és az IGFB proteinek szintézisének gátlásával szintén az IGF1 és IGF2 szintjének növekedését fogja

okozni, a célszerveken kialakított hatások fokozásával. Az IGF rendszer szabályozásában az inzulinnek döntő szerepe van, hiperinzulinémiában egy önerősítő kör alakul ki az inzulin és az IGF-ek működésében az ováriumokon, amely végső soron a hiperandrogenémiát erősíti (Brismar 1994, Morales 1996). Willis ezzel szemben az IGF rendszer helyett direkt inzulin hatásról ír az ováriumon, amely az inzulin cognate receptorán keresztül lép működésbe (Willis 1995), ezt egy új összefoglaló tanulmány is megerősíti (Diamanti-Kandarikis 2012).

Az inzulin receptoron bekövetkező jelátviteli hiba, a már ismertetett (tirozin helyetti szerin foszforiláció) nemcsak a glukóz sejten belüli felhasználását gátolja fibroblaszt és izomsejtenyészetekben (Dunaif 1996), hanem a P450c-17 enzim aktivitásának serkentéséért is felel embrionális adrenális sejteken (Zhang 1995). Így ez az egyetlen momentum az inzulin rezisztenciát és a hiperandrogenémiát lényegileg kötheti össze, melyek a PCOS kialakulásáért aztán egyenlő mértékben felelhetnek.

A hím nemi hormon termelés fokozódásáért az esetek 25%-ában a mellékvesék is felelősek. Az adrenális androgén túlprodukciónak eredete sem teljesen tisztázott még, bár több centrális és perifériás ok is felmerült ennek hátterében. A centrális tényezők közül elsősorban a hipofízisben, a CRH -ra kialakuló túlérzékenység hipotézise (Lanzone 1995) szerepel az első helyen, míg a perifériás tényezők között megint az inzulin játssza a legfőbb szerepet. Az inzulin számos hatása között van ugyanis a 17 alfa-hidroxiáz és a 17,20-liáz enzim aktivitásának serkentése is, egyrészt közvetlenül a mellékvesékben (L'Alleman 1996), valamint az ACTH stimulációján keresztül is (Moggetti 1996). A DHEA elválasztás fokozásában egy citokinnek, az IL-6 (interleukin-6)-nak is jelentőséget tulajdonítanak a mellékvese kéreg szteroidogenezisben (Rosenfield 1999). A kortizol metabolizmusában is találtak potenciálisan a PCOS-t előidéző eltéréseket: Rodin és munkatársai a 11- béta hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim aktivitásáról mutatták ki (ez az enzim alakítja az aktív kortizolt inaktív kortizonná), hogy túlműködése a feed back mehanizmus alapján a hipotalamusz-hipofízis tengelyen hatva fokozott ACTH kiramlást okoz és így nagyobb androgén szinteket hoz létre (Rodin 1994). Más kutatók is kimutatták a 11-béta hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim túlműködése következtében kialakult hiperandrogenémiát, túlsúlyos policisztás ovárium szindrómában szenvedő nőknél (Pasquali 2000).

3.2.3. Hipotalamusz-hipofízis-petefészek tengely

A PCOS etiopatológiai hátterét a primér neuroendokrin elmélet I sem tisztázták teljesen. Ismeretlen eredetű a gonadotrop hormon (GnRH) elválasztásának fázikus amplitúdóbeli növekedése, és az elválasztás frekvenciájának sűrűsödése is. Ugyanakkor a következményes LH hiperszekréción és az LH/FSH arány növekedése alapvető jelenség a policisztás ovárium szindrómában (Yen 1980, Barnes 1989, Hayes 1998, Baken 2004). Az emelkedett LH és csökkent FSH szint fokozott ovariális androgén és ösztrogén termelést eredményez. Az LH a téka interna sejtjeinek szteroidszintézisét növeli, hatására a bioszintézis az androsztendion-tesztoszteron lépésekig felgyorsul, és ez az androgén túlsúly már nem kedvez a normális hipofízis feed-back mechanizmus működésének, önmagát fenntartó ördögi kör alakulhat ki. Ugyanakkor a megnövekedett tesztoszteron és androsztendion az aromatáz enzim működése következtében ösztroinná, ösztradiollá (E2) és ösztriollá alakul, melyek nagyobb része az antrális folyadékba kerül, kisebb része viszont a keringésbe jut, és az FSH szekréciónak további csökkenését fogja eredményezni. Élettani működés esetén az androgének további diffúziója során a tüszőtől „távolodva” a szomszédos folliculusokban atréziát indukálnak lokális és parakrin hatásokkal, és a hiperandrogén környezet létrehozásával. Az élettani működés során a domináns folliculusban az LH és FSH hatására létrejövő granulózasejt szaporulat a helyi androgéneket aromatizálja, míg a „parakrin hatósugárban” a hiperandrogén környezet következtében atrézia jön létre. Ezek hatására jelentősebb GnRH és LH, és kisebb mértékű FSH csúcs kialakulása, majd a plazminogén-plazmin rendszer aktiválódásán keresztül a normális ovulációhoz szükséges hormonális és proteolitikus rendszerek működése és tüszőrepedés jön létre. A rövid ideig tartó androgénhatás felfüggeszti a granulózasejtek apoptózisát, ezzel az antrális folliculusok életidejét növeli, amely a normális ciklus során a domináns folliculus kiválasztásához járul hozzá (Várbíró 2009). Az elhúzódó, tartós androgén hatás következtében azonban atrézia fejlődik ki. Mindezek következtében és a fokozott LH hatás mellett az ováriumok téka és stroma sejtjeinek hiperpláziája figyelhető meg, a tüszők nem tudnak felrepedni, és így az érő petesejt nem tud „kiszabadulni” az ováriumban apró ciszták fejlődnek ki. Mindez anovulációhoz vezet és krónikus hiperandrogenémiát tart fenn. (Yen 1980, Szilágyi 1991, Ehrmann 1995, Nelson 1999,

Speer 2009, Bremer 2010). Jelenleg úgy gondolják, hogy a GnRH megnőtt elválasztása másodlagos jelenség (akár a pulzáció frekvenciájában, akár az egyes hormon lökések mennyiségében), esetleg az ovárium által küldött gyenge feed-backre regáló válaszként alakul ki, a perzisztáló hiperandrogenémia ugyanakkor gyengíti a választ a progeszteron feed-back-re és fenntartja az LH szint növekedést, ez pedig az ováriumokat további androgén kibocsátásra ösztönözi (Solorzano 2010).

3.2.4. Genetikai predispozíció

A policisztás ovárium szindrómában szenvedő betegek genetikai érintettségére a családokon belüli, a leánytestvéreken észlelt halmozódó hiperandrogenémia, és az esetek egy részében manifeszt megbetegedés alapos gyanúra ad okot. Számos családi vizsgálat arra utalt, hogy autoszomális domináns öröklésment követhető nyomon (Franks 1997, Govind 1999), melyeket környezeti tényezők alakítanak tovább (Diamanti-Kandarakis 2006). Jónéhány gén mutációjának, polimorfizmusának szerepe nyert már igazolást a policisztás ovárium szindróma genetikai összefüggésében, leggyakrabban a CYP 11 A, CYP 17 A és CYP 19 A géneké. Az inzulin és az inzulin receptor közeli régió génjei is gyanúba kerültek (Legro 2002). A legújabb kutatások során az infertilitás okainak tisztázására és előzetes szűréséhez kiterjedt genetikai vizsgálatok eredményeit gyűjtötték össze, ezek között a PCO szindróma génjei is tanulmányozásra kerültek (Fauzer 2011). Az eddig megismerteken túl, további genetikai eltéréseket hoztak összefüggésbe a policisztás ovárium szindrómával, több mint 70 gén esetleges és valószínű szerepét vizsgálták, azonban egyedül vagy kizárólagos eltérést ezideig nem sikerült kimutatni (Mukherjee 2010).

3.3. A PCOS metabolikus jellemzői

- Diszlipidémia

A vérzsírháztartás zavara nagyon gyakran jár együtt a PCO szindrómával (Meyer 2005). Jellemzője a magasabb triglicerid szint és a csökkent HDL-koleszterin szint (Wild 1995). A diszlipidémia oka is multifaktoriális PCOS-ben, és a testtömeg indextől függetlenül is kialakulhat. Az obezitás kedvezőtlen hatása akár az inzulin rezisztencia,

akár a kedvezőtlen triglicerid és HDL-koleszterin érték szempontjából egyértelmű, ugyanúgy, mint kettes típusú diabétesz mellitusban is (Wild 1985). A diszlipidémia patogenezisében is döntő jelentőségű az inzulin rezisztencia mivel megváltoztatja lipoprotein lipáz és a hepatikus lipáz expresszióját, a lipolízist pedig fokozza.

- Inzulin rezisztencia és a glukóz háztartás zavara

A policisztás ovárium szindrómában szenvedő betegek 50-70%-ában inzulin rezisztencia mutatható ki, elsősorban azokban, akik túlsúlyosak (Legro 2004). A soványabb betegek között kevésbé gyakori az IR megjelenése (Vrbikova 2004). Összehasonlító vizsgálatot végeztek normális és túlsúlyos policisztás ovárium szindrómában szenvedő nőbetegekben, és az inzulin rezisztencia és az obezitás közötti szoros összefüggést ez egyértelműen alátámasztotta (Conway 1992), bár vannak adatok arra is, hogy az inzulin rezisztencia a sovány PCOS-es nőkben is fontos tényezője a kórképnek. Ugyanakkor az obez, policisztás ovárium szindrómában szenvedő nőkben az éhomi és a terheléses inzulin szintek is szignifikánsan magasabbak voltak, mint a hasonló diagnózisú, de soványabb nőbetegekben (Morin 2000). Az inzulin érzékenység is hasonló összefüggést mutatott az összehasonlító vizsgálatok alapján, vagyis a túlsúlyos PCOS-es nőkben az inzulin rezisztencia nagyobb mértékű (Grulet 1993, Morin 2000), az inzulin érzékenység pedig csökkent. PCOS-ben a csökkent glukóz tolerancia és a diabétesz mellitusz kialakulásának valószínűsége többszöröse nő meg, ha azonos korosztályú és testtömegű egészséges nőekkel hasonlítjuk össze (Legro 1999). A fiatalabb korban kezdődő glukóz háztartásbeli zavarok miatt a csökkent glukóz tolerancia is hamarabb alakul át diabétesz mellituszba (Ehrmann 1999), és a gesztációs diabétesz kialakulásának gyakorisága is nagyobb (Boomsma 2006).

- Az obezitás metabolikus jellemzői

Az obezitás az SHBG szint csökkentésével (Pasquali 1993) önmagában fokozza a szabad androgén szintet. A szexuálhormon kötő fehérjét a máj termeli, ami a kötődési helyeken a tesztoszteront és a dihidrotesztoszteront nagyobb affinitással képes befogni mint az E₂-t (Hautanen 2000). Az SHBG szintet az ösztrogén, a pajzsmirigyhormonok, a növekedési hormon és a kortizol is növeli, ugyanakkor az androgének, az inzulin, a prolaktin és az IGF-1 csökkenti. Jól ismert tény, hogy PCOS-ben szenvedő hölgyek

zsíreloszlása nem egyenletes, a hasi zsírpárna nagyobb még azokon is, akik nem túlsúlyosak (Kirchengast 2001). A hasi zsírszaporulatnak nagy a jelentősége a PCOS-ben mivel a hiperandrogenémia jóval nagyobb ezekben az esetekben, mint a perifériás elzsírosodás mellett (Pasquali 1993, 1994) érthető módon a BMI-től függetlenül is. A csökkent SHBG szint pedig fenntartja a magas androgén szintet.

Az inzulin a májban képes az SHBG szintézis gátlására, tehát fontos szerepe lehet az SHBG szint csökkentésében az IR-ens, hasi elhízásban szenvedő policisztás ovárium szindrómás hölgyekben (Plymate 1988). A szexuálhormonkötő fehérje csökkent szintje a szabad és a biológiailag aktív hormonok szintjét emeli, és fokozza annak célszervi hatásait. Ez pedig teoretikusan a hasi obezitás fenotípusának kialakulásában játszik szerepet. Az androgén hatására a hasi zsírszövet a posztmenopauzális korú nőkben is felszaporodik legyenek akár soványak vagy kövérek eredetileg (Rosenfield, 1999).

3.4. Kardiovaszkuláris veszélyeztetettség

A PCOS-ben szenvedő nőbetegeknek a szív és érrendszeri kockázata megnő mind a menopauza előtt, mint pedig a menopauza után. Az egész életen át tartó rizikó növekedés alapja az emelkedett androgén szint, a szénhidrát háztartás zavara az inzulin rezisztencia és a krónikus gyulladás laboratóriumi jegyei, amelyek a menopauza után is kimutathatóak (Puurunen 2009, 2011). Diszlipidémia, hipertónia, és hiperandrogenémia gyakrabban vannak jelen, bizonyos gyulladáshoz köthető markerek és a protrombotikus állapot mutatói emelkedettek. Ezekkel párhuzamosan a csökkent glukóz tolerancia, és a diabétesz mellitusz kialakulásának jóval nagyobb a valószínűsége, így a szív és érrendszeri megbetegedések és események bekövetkeztének hosszútávú rizikója is fokozódik (Norman 2007).

Meyer és munkatársai prospektív vizsgálatban hasonlították össze 100 túlsúlyos PCOS-es és 20 hasonló korú, PCOS-ben nem szenvedő, csakis obez nő hormonértékeit, inzulin és vércukor szintjeit, lipid paramétereiket, a hsCRP-t és érrendszeri jellemzőiket a kardiovaszkuláris rizikó felmérése céljából. Az érrendszer állapotának felmérésére a pulzus hullám terjedési sebességét (PWV), a carotisok állapotának mérésére intima és media vastagságát és annak az arányát (IMT), az endotél funkciójának megítélésére az áramlás indukálta dilatációt (FMD), és 24 órás ambuláns vérnyomás mérést (ABPM)

választották. Az eredmények igazolták a feltételezést, ugyanis a kontrollal összehasonlítva az éhomi inzulin értékek, a HOMA mérések alapján számított inzulin rezisztencia mértéke, illetve az összkoleszterin és a triglicerid értékek is magasabbak voltak a PCOS csoportban. A pulzus hullám terjedési sebesség mérésekből az arteriás falmerevség fokozódására, az alkari áramlás indukálta ér dilatációk csökkenéséből pedig az endotél funkció zavarára lehetett következtetni a PCOS-es betegekben. Ugyanakkor a vérnyomásmérésekben és a carotis intima media vastagságban nem volt szignifikáns különbség a vizsgált csoportok között (Meyer 2005). A kardiovaszkuláris rizikó a kardiometabolikus rizikó fokozódás miatt, az úgynevezett klasszikus, a Stein-Leventhal féle fenotípusban a legnagyobb, amely egyébként a leggyakoribb előfordulási forma is. 2010-ben Wild és munkatársai az Amerikai Androgén Excessus társaság nevében Konszenzus Megállapodást tettek közzé a policisztás ovárium szindrómában szenvedő nők kardiovaszkuláris veszélyeztetettségéről és annak prevenciójáról. Ebben az addigi leglényegesebb ismereteket összegezték (Wild és mtsai. 2010). Az eddigiekkel szemben áll az Iftikhar és munkatársai által végzett retrospektív kohort vizsgálat eredménye, amelyben Olmsted városban, Minnesota államban áttekintették az 1966 és 1986 között PCOS-el diagnosztizált nők (n=309) kardiovaszkuláris eseményeit az ugyanebből a városból származó PCOS nélkül (n=343) követett nők klinikumával. A visszatekintés eredményei szerint a kardiovaszkuláris események számában nem mutatkozott szignifikáns különbség, sem miokardiális infarktus, sem stroke, sem az összhalálozás, sem a kardiovaszkuláris halálozás szempontjából. Az is megállapítást nyert, hogy bár a PCOS-ben szenvedő betegek testsúlya szignifikánsan nagyobb volt, az egyéb rizikófaktorok vonatkozásában nem tudtak a szignifikancia mértékét elérő különbséget kimutatni (Iftikhar és mtsai, 2012). A megfigyelések értékét némileg csökkenti, hogy ezek az eredmények nem tervezett, randomizált prospektív vizsgálat adatai, hanem utánkövetéses elmezés eredményei, de mindenesetre Olmsted városban a középkorú PCOS-es nőbetegek kardiovaszkuláris rizikója nem tért el az átlagostól. Ugyanakkor deGroot és munkatársai 2011-ben közzétett alapos és szisztémás metaanalízise 2000-2008-ig terjedő időszakban a kontrollált obszervációs vizsgálatok adatait alapul véve (1340 cikket és 5 utánkövetéses vizsgálatot tanulmányoztak, és ezeknek az eredményeire alapoztak) arra a megállapításra jutottak, hogy a koszorúér megbetegedés és a stroke rizikó kétszeresére nő PCOS-ben, és ez a BMI növekedéssel is

összefüggésben van (deGroot 2011). Dokras összefoglaló közleménye is az inzulin rezisztencia, diabétesz mellitusz, hipertónia és diszlipidémia együttes jelenlétére hívja fel a figyelmet PCOS-es nőbetegeken. Ezek az elváltozások endoteliális diszfunkció kialakulásához, az artéria carotis intima-media vastagság megnövekedéséhez és koszorúér kalcifikációhoz vezethetnek az azonos korú, kontrollként vizsgált nőkkel történő összehasonlításban. Megállapítást nyert, hogy bár az obezitás gyakori a policisztás ovárium szindrómában szenvedő nőkben, de a fenti eltérések az elhízástól függetlenül is kimutathatók. Mindezek miatt a szerzők, a serdülő, és fiatalkorú (<18 év) nők szűrését policisztás ovárium szindrómára és a szív és érrendszeri rizikó szempontjából történő preventív intézkedéseket igen fontosnak tartják (Dokras és mtsai, 2008).

3.5. Vaszkuláris változások PCOS-ben

Amint láttuk a szív és érrendszeri események rizikója a PCOS-ben szenvedőkben élethosszigan nagyobb, s ezt a feltételezések szerint a rizikó faktorok együttes hatása okozza. A patofiziológiai alapokról, az erek reaktivitásának változásáról PCOS-ben már kevesebb adat áll rendelkezésre. Lakhani és munkatársai az alkar mikrovaszkuláris keringését vizsgálták lézer doppler ultrahang segítségével ACh és nitroprussid natrium iontoforetikus alkalmazásával, PCOS-ben szenvedő nőkben és kontrollokban. Az ACh-ra kapott válaszreakció a PCOS-es nőkben egyértelműen csökkent, míg nitroprussid nátrium hatására nem volt változás. Ezzel a szellemes vizsgálattal a PCOS-ben kialakult endotélium diszfunkciót lehetett igazolni (Lakhani 2005). Ugyanez a munkacsoport korábban a nagy nyaki verőér pulzatis indexének beszűkülése melletti kardiovaszkuláris rizikófaktorozódást mutatott ki PCOS-es nőkben (Lakhani 2000). Szintén Lakhani és munkatársai az ateroszklerózist megelőző, igen korai jelként vizsgálták a fiatal, 35 évnél fiatalabb policisztás ovárium szindrómás nők nyaki verőérének és fő combverőereinek intima-média vastagodását (IMT) a hasonló korú egészséges nőkével összehasonlítva, azokat kontrollul véve. Az összehasonlítás a korai ateroszklerózist bizonyította policisztás ovárium szindrómában szenvedőkben (Lakhani 2004). Talbott és munkatársai szintén az IMT megvastagodását mutatták ki PCOS-ben, és ez a munkacsoport mutatta ki a későbbiekben policisztás ovárium szindrómában a

metabolikus szindrómához társult koszorúér és aorta kalcifikációt is hasonló klinikai háttérű nőbetegeken (Talbot 2000 és 2004). Az endotél diszfunkció igazolását policisztás ovárium szindrómában több kutatócsoport is célul tűzte ki. Kravariti és munkatársai 62 fiatal PCOS-ben szenvedő nőbeteg alkari áramlás indukálta érátmérő tágulásának (FMD) mérésével 2005-ben, Brinkworth és kutatótársai ugyanezt túlsúlyos és kövér PCOS-es nőbetegeken vizsgálták 2006-ban. Mindkét kutatócsoport úgy találta, hogy az endotél funkciójának romlása az ateroszklerózis korai jeleként ezzel a módszerrel PCOS-ben kimutatható (Kravariti 2005, Brinkworth 2006). Arian és munkatársai úgy találták, hogy az inzulin rezisztencia önmagában nem fokozza az endotél diszfunkciót és nem növeli az IMT-t nyaki verőerekben (Arian 2008). Ez a megállapítás egybeesik Sorensen megfigyeléseivel, aki szerint a fiatal policisztás ovárium szindrómában szenvedő nők kimutatható súlyos endotél diszfunkciójára nem szolgáltat kielégítő okot és magyarázatot csupán a kardiovaszkuláris rizikó faktorok jelenléte (Sorensen 2006). Az inzulin vazodilatatív érhatására az 1990-as évek elején derült fény Baron inzulin rezisztenciát kimutató kísérletei alapján, ugyanis meglepetésre, a vizsgált patkány hátsó végtag keringése az alkalmazott inzulin hatása mellett megnőtt (Baron 1991). A vazodilatáció mechanizmusa mára nagyjából ismert. Döntő részben az inzulin receptor közreműködésével, endoteliális NO szintáz útvonalon keresztül váltja ki a vazorelaxációt endotélium függő módon, de ezen túlmenően a simaizom Ca^{2+} koncentrációjának csökkentése révén endotéliumtól független módon is (Han 1995, Vischer 1998). Mezenterialis patkány ereiben az EDHF (endothelium derived hyperpolarizing factor) szerepét is igazolták mely Ca^{2+} által aktivált K^{+} csatornák közreműködésével hat (Katsuaki 1999, Iida 2001, Kimura 2002). Contreras és munkatársai cukorbeteg patkányok koszorúérereiben is igazolták az Akt kináz és az endoteliális NO szintáz szerepét az inzulin vazodilatatív hatásában (Contreras 2011). Több vizsgáló kutatta a vazodilatációs kapacitás működését és annak funkcionális beszűkülését diabéteszben, vagy inzulin rezisztenciában (Natali 2006, Wu 2009). Ghafouri érdekes vizsgálatában patkányokon fizikai aktivitással, futószalagos gyakorlattal mérhető módon megnövelte a vazodilatatív kapacitást, és ezzel a mozgás prevenciók élettani hatását igazolta (Ghafouri 2011).

3.6. A D-vitamin hatásai PCO szindrómában

A D-vitamin hiányát és a policisztás ovárium szindróma összefüggéseit sokan tanulmányozták. A D hipovitaminózis az európai lakosság legalább 40%-át érinti, észak felé haladva ez eléri a 60-80%-ot is (Takács 2012), PCOS betegekben pedig 80%-ban mutatható ki (Li 2011).

A vizsgálatok eredménye alátámasztotta, hogy a D-vitamin hiánya a metabolikus szindróma kórélettani okai között szerepelhet (Hahn 2006, Wehr 2009). Ezt a feltételezést igazolja az a tény, hogy ismereteink szerint a D-vitamin receptor génje a humán genom legalább 3%-át szabályozza, és ezek között azokat is, amelyek döntő tényezői a zsíryanycsere, a glukózanyagcsere szabályozásának és a vérnyomás kontrollálásának (Holick 2007, Pittas 2007, Freundlich 2008).

Azt a feltételezést, hogy az inzulin rezisztencia és a kettes típusú diabétesz mellitusz gyakran D-vitamin hiányos állapottal jár együtt, több klinikai vizsgálat is megerősítette (Isaia 2001, Chiu 2004). Kotsa és munkatársai túlsúlyos, policisztás ovárium szindrómában szenvedő nőknél igazolták, hogy D-vitamin analóg adásával az inzulin rezisztencia korrigálható, és a kezelés hatására a lipidprofil is kedvező irányban változott (Kotsa 2009). A D-vitamin hiánya PCOS-ben gyakoribbnak mutatkozott az átlag populációnál és a tünetek súlyosságával is arányosnak bizonyult (Kotsa 2009). Thys-Jacobs 1999-ben a policisztás ovárium szindrómában adott D-vitamin kezeléssel rendezte a betegek menstruációs ciklusát, és az infertilitást is sikerült részlegesen megszüntetnie (Thys-Jacobs 1999). Selimoglu és Wehr hasonlóan, nagy dózisú D-vitamin adagolással, kis esetszámú PCOS-es vizsgálatokban rendezte a ciklust és a fertilitási képességet (Selimoglu 2010, Wehr 2011). Az irodalom és a hazai konszenzus is javasolja a D-vitamin adását policisztás ovárium szindrómában (Takács 2012).

A D-vitamin hiány rendezésével egyéb betegségekben is lehetett eredményeket elérni, így például spontán hipertenzív patkányok szívelégtelenségét (SHHF) mérsékelni tudták (Przybylski 2009). Spontán magas vérnyomásban szenvedő patkányokban D-vitamin adásával az endotél dependens kontrakciók csökkenését érték el, és antihipertenzív hatást is ki lehetett mutatni (Wong 2008). Hat héten át kezeltek spontán hipertóniás patkányokat D-vitamin származék fiziológiás dózisaival, és Wistar patkányokkal hasonlították össze az értékeiket, és míg a szérumban a D-vitamin szint szignifikáns

mértékben megnőtt a kontrollokéval összevetve, addig az artériás vérnyomás átlagértéke szignifikáns mértékben csökkent a D-vitaminnal kezelt állatokban. A kísérletekben az ér farmakológiai válaszkészségét a patkány aortagyűrűkön izometriás erőmérésekkel vizsgálták szervfürdőben, ép és denudált endotéliummal. A D-vitamin kezeléssel a COX-1 expressziójának csökkentését lehetett kimutatni, és az endotéliumfüggő kontrakció is mérséklődött, a sejten belüli Ca^{2+} szint változása nélkül (Wong 2008). Simpson 1987-ben D-vitamin hiányos hím patkányok aorta gyűrűin a vazokonstriktió reverzibilis fokozódását mutatta ki, amelyet calcium, foszfát és D-vitamin pótlással vissza lehetett fordítani (Simpson 1987). A D-vitamin SHR patkányoknál akut adagolásban csökkentette az endoteliális diszfunkció mértékét az endotélfüggő, 6-keto-PGF1-alfa vazokonstriktió mérséklésével (Wong 2010).

3.7. A PCOS modellek

A PCOS etiológiája és patogenezeise még a mai napig is sok tekintetben tisztázatlan, a téma teljes körű feltárására kiterjedt és intenzív kutatásokat folytatnak. Az irodalomban felmerül annak a kérdése, hogy melyik az az ideális szemléltető lehetőség a betegség modellálására (majom, bány és rágcsáló modellek közül) amelynek tanulmányozása leginkább segít az okok megismerésében és felderítésében. A betegség modellálására születés előtti androgenizálással létrehozott PCOS a rhesus majomban kellőképpen hasonlít a humán betegség klinikai megjelenésére; hiperandrogenémiával, anovulációval, policisztás ováriumokkal, elhízással és inzulin rezisztenciával. Ezek a főemlős modellek azonban drágák, és ezért nem terjedt el a használatuk. A rágcsáló modellek ezzel szemben olcsó, a rövidebb életciklus miatt gyorsabban és könnyebben hozzáférhető lehetőséget biztosítanak a kutatás számára. A prenatális androgén behatással létrehozott rágcsáló modellekben nem konzekvens az anovuláció létrejötte. A születés után alkalmazott androgén behatás mellett azonban típusos metabolikus eltérések, és az anovuláció is detektálható (Walters 2012).

Beloosesky 2004-ben Wistar patkányokon tesztoszteron injekciók adásával hozott létre policisztás ováriumokat és a hiperandrogenémiát, és ezzel anovulációt valamint inzulin rezisztenciát indukált (Beloosesky 2004). Manneras (2007) és Yanes (2011) folyamatos hormonkibocsátó DHT pellet alkalmazásával olyan modellt tudott létrehozni, amely sok

tekintetben hasonlított az emberi PCO szindrómára. Az állatok súlya megnőtt, a hasi zsírszövet felszaporodott, megnagyobbodott zsírsejtek alakultak ki, és a kórkép emelkedett leptin szinttel és inzulin rezisztenciával járt. Ezek a metabolikus eltérések a női policisztás ovárium szindrómában is jelen vannak, és kísérleteinkhez mi is ezt a modellt választottuk.

Ezen túlmenően ösztrogén (Brawer 1989), aromataz inhibitor (Kafali 2004), antiprogesteron (Lakhani 2006) adagolással is lehet PCOS modellt kiváltani. Genetikai beavatkozással is több módon lehetett PCOS modellt létrehozni, például a leptin mutáns rágcső törzs kialakításával (Kero 2003), vagy luteinizáló hormont túltermelő transzgenikus egér létrehozatalával (Hamm 2004), illetve egerekben a plazminogén aktivátor inhibitor-1 expressziójának transzgenikus fokozásával (Devin 2007).

3.8. A szexuál szteroidok hatása a kardiovaszkuláris rendszerre

A férfiak és nők közötti alapvető a különbség van a szív és érrendszeri megbetegedések gyakoriságában, amelynek az aránya a női változás korának beálltával kezd kiegyenlítődni. A nők hiperandrogén állapotaiban fellelhető fokozott kardiovaszkuláris rizikó arra enged következtetni, hogy a nemi hormonoknak kulcsszerepe lehet az arterioszklerózis kialakulásában és a szív és érrendszeri megbetegedésekben. Napjainkra egyértelművé vált, hogy a nemi hormonok élettani hatásai szex specifikusak az érrendszerre és a kardiovaszkuláris rizikóra egyaránt. Az utóbbi évtizedekben derült fény arra, hogy a rizikófaktorokat nem lehet azonos súllyal kezelni a két nemből, mert például a diabétesznek, különösen akkor, ha hipertóniával is társul jóval nagyobb a jelentősége a nőkben, mint a férfiakban (Barret-Connor 1991, Ding 2006). A fölösleges súly eloszlása a testen mindkét nemből a saját nemi hormon csökkent működésével hozható összefüggésbe. Posztmenopauzában az E₂ önmagában, vagy progeszteronnal kombinálva csökkenti a súlyfölsőletet, és visszaalakítja a zsíreloszlás arányát a hím nemi jellegtől a női, gynoid zsíreloszlás felé, vagyis a hasi zsírszövet mennyisége csökken. Férfiaknál is ugyanúgy, az idősebb korban adott tesztoszteron kiegészítés hatására szintén a hasi zsírszövet csökken. A hasi zsírszövet önmagában kardiovaszkuláris rizikótényező, mert a lipid és szénhidrát háztartásra, sőt a vérnyomásra is jelentős befolyást gyakorol. A hasi zsírszövet felszaporodása mindkét

nemben növeli az izulin rezisztenciát, a hipertrigliceridémiát és a kis LDL-koleszterin részecskéknek az arányát. Ugyanakkor szimpatikus túlsúlyt tart fenn, ez pedig magas vérnyomást okoz. Ezek mind szív és érrendszeri kockázatnövelő tényezők. A hasi zsírszövet a hormon ellátás szempontjából is fontos szerepet tölt be. Férfiakban a hasi zsírszövet alacsony androgén szinttel jár, mivel benne fokozódik az E₂ produkció a tesztoszteron ösztrogénné konvertálódása következtében, míg nőkben a hasi zsírszövet magas androgén szinttel jár a csökkent SHBG szint következtében.

3.8.1. A nemi hormonok direkt szív és érrendszeri hatásai

A nemi hormonok direkt szív és érrendszeri hatásai igen sokrétűek, mivel indirekt módon a fent említett rizikótényezőkre gyakorolt befolyással is kifejtik a hatásukat. A hím és női nemi hormonok azonban közvetlen módon, direkt is hatnak a szív működésére, genomikus és non genomikus úton befolyásolják az érrendszeri tónust, az endotélium működését, többnyire receptorfüggő módokon (Mendelsohn 2005). Az androgén és ösztrogén receptorok a szív és az érrendszer minden sejtjén megtalálhatók, az endotéliumon, a simaizomsejteken, a szívizomsejteken, a makrofágokon, és a trombocitákon. Az elhelyezkedés sűrűségét tekintve konzekvens nemi jellegzetességeket mutattak ki (Mendelsohn 2005).

3.8.2. Ösztrogén hatások

Az E₂ csökkenti a szisztémás vaszkuláris rezisztenciát, javítja a koszorúerek és a perifériás erek endotél funkcióját élettani szerepe szerint a teljes élettartam ideje alatt és ez a hatása a menopauza után is fennmarad (Volterrani 1995, Rosano 2006a, Williams 1998, Rosano 2006b). Az ösztrogén szerepét a kardiovaszkuláris megbetegedések és események kialakításában férfiak esetében is kutatták, mivel hím állatokon végzett ballonkatéteres tágítást követően az ösztrogén- béta receptorok expressziója megnőtt (Lindner 1998, Aavik 2001). Olyan férfiak esetében, ahol mutáció következtében az E₂ receptor, vagy E₂ szintézis hibás úton megy végbe, korai arterioszklerózis kialakulását detektálták és endotéliális diszfunkciót mutattak ki (Sudhir 1997,1997/a, Carani 1997, Smith 1994).

Az ösztrogén genomikus hatásainak a vaszkuláris sejtekben az endotél diszfunkció korrigálásában, vaszkuláris sérülésekre adott válaszbán van szerepe, de az arterioszklerózis kialakulásában, vagy annak feltartóztatásában is lehet funkciója (Mendelsohn 1995). A válaszok az ösztrogén alfa és béta receptorokon keresztül valósulnak meg. Állatkísérletek tanúsága szerint az alfa receptorok az érfali sérülés és az arterioszklerózis kialakulásának kivédésében játszanak szerepet (Hodgin 2001, Pare 2002). Az ösztrogén béta receptorok az értónus és a vérnyomás szabályozásban szereplő géneket modulálják (Zhu 2002), és a nyomás vezérelt bal kamrai hipertrófia kialakításában működnek közre (Skavdahl 2005). Megállapítást nyert, hogy ovariektomizált nőtény patkányok mikrovaszkuláris ereiben az ösztradiol akut vazodilatatív hatása krónikus ösztrogén előkezelést követően csökken (Kakucs 2001). Az ösztrogén akut vazodilatatív hatása intrakoronáriás infúzió kapcsán mérve koszorúérbeteggekben eltérő hatást mutatott férfiakon és nőkn. Nőkben endotél működés javításával fokozta a coronária átáramlást, férfiakban ez nem következett be (Collins 1995). Menopauza után az ösztrogén hatása az eltelt idővel arányosan csökken, így évekkkel később alkalmazva azt, az E₂ hatása gyengül (Vitale 2008). Az E₂ akut és gyors vazodilatatív hatása döntően az endotélium dependens relaxáció útján megy végbe az endotélium sejtek caveoláiban ülő ösztrogén receptorok közvetítésével (Chambliss 2002).

3.8.3. A nemi hormonok arterioszklerózisra gyakorolt hatása

A nemi hormonok ateroszklerózisra gyakorolt hatását jól demonstrálja Appt vizsgálata. A petefészkek eltávolítása után a koleszterindús étkezésen tartott női főemlősök arterioszklerózisa fokozódik, de ösztrogén kezeléssel a folyamat feltartóztatható (Appt 2006). A nők ösztrogénhiányos állapota, természetes vagy sebészi úton kiváltott menopauza az arterioszklerózis progresszióját idézi elő (Wuerst 1953), amelyet a korai ösztrogén pótlás jótékony irányba változtat meg (Sullivan 1996). Hím nemi hormonok a hím állatokban hasonló hatásúak. Egereket és nyulakat kasztrációt követően, majd tesztoszteron adagolás után vizsgálva, a női nemi hormonokkal egyező, az arterioszklerózisra gátló hatást írtak le a hím nemi hormonnal kapcsolatban is (Alexandersen 1999). A tesztoszteron hatása azonban különbözött a hím és a nőnemű

állatokban. Bruck és munkatársai kísérleteiben hím nyulakban a tesztoszteron vagy a tesztoszteron + ösztradiol adása mellett az ateroszklerotikus plakkok mérete csökkent, nőstény nyulakban a tesztoszteron adagolás hatására viszont nőtt a plakkok száma és mérete a kontroll csoporttal összehasonlítva (Bruck 1997).

Az állatkísérletes adatok arra utalnak, hogy a hiperandrogén milieu nőkben, akár a posztmenopauzális időszakban, vagy a policisztás ovárium szindrómában alakul ki, felgyorsítja az ateroszklerózis folyamatát. A PCOS-ben szenvedő nőkre vonatkozó obszervációs vizsgálatok adatai alátámasztják azt a feltételezést, hogy a nagyobb tesztoszteron szinttel nagyobb kardiovaszkuláris rizikó jár együtt (Wild 2000).

3.9. A PARP jelentősége a sejtek működésében

A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 enzim a sejtmag állandó komponense, tanulmányozása az utóbbi két évtizedben az érdeklődés homlokterébe került. Megállapították, hogy a PARP enzimnek jelentős szerepe van a nitrozatív stressz és a sejten belüli élettani működések szabályozása szempontjából (Virág 2005). A sejt működés fiziológiájában a DNS sérülésre adott válaszokban a PARP-1 aktiválódik. A sérült DNS-hez kötődve a PARP-1 katalizálja a NAD^+ szétvágását nikotinamidra és ADP-ribózra, ez utóbbit polimerizálja és ADP ribóz láncokat hoz létre melyet a sejtmag befogadó fehérjéihez, hisztonhoz, – ez a transzkripció faktor – kapcsol önmagával együtt. A poli ADP riboziláció kezdetben elősegíti a DNS hiba kijavítását. Azonban, ha a PARP enzim működése, túlzott működése közben felhasználja a szubsztrátjait a NAD^+ -ot és ATP-t, az enzimátikus működés Janus arcúvá válik, ugyanis ilyenkor már a sejt élettani működését nem segíti, hanem gátolja. A túlzott működés következtében lelassul a glikolízis, a Krebs ciklus, az elektron transzport és az ATP szintézis. Így a ribozilált fehérjék a gyulladással járó folyamat alkotórészeivé válnak, és ez a sejt működésének funkcionális gyengüléséhez, a sejt halálához is vezethet. Míg az enyhe genotoxikus PARP-1 aktiváció a DNS javítását és a sejt túlélését segíti elő, a javíthatatlan DNS károsodás apoptotikus vagy nekrotikus sejthalált vált ki (Virág 2005). Ez a mechanizmus több emberi megbetegedésben is fellelhető, és működését igazolni lehetett mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között (Pacher 2008). Logikus az a feltételezés, hogy a PARP-1 enzim gátlásával a sejtkárosodások és az esetleges sejthalál

kivédésére és megelőzésére lehetnének képesek. Számos klinikai helyzetben kísérletes körülmények között igazolást nyert ez a feltételezés; többek között miokardiális iszkémia és reperfúziós károsodás, szívelégtelenség és miokardiális hipertrófia állatmodelljein (Pacher 2007). Különböző rágcsáló modellekben, így diabéteszes kardiomiopátiában a szívizomsejtek és az endoteliális sejtek károsodása mellett, a sejtek poli-ADP ribozilációját is igazolták, és ugyanakkor képesek voltak PARP gátló alkalmazásával a sejtkárosodást mérsékelni (Soriano 2001, Szabó 2006). Faro és munkatársai disznó szíven PARP gátlószer alkalmazásával az infarktus méretét csökkentették (Faro 2002), Pacher és munkatársai hipertrofizált patkány szíven PARP gátló hatására a hipertrófia mértékének csökkentését és a funkció javítását tudták előidézni (Pacher 2002).

Az utóbbi években a poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) aktivitását befolyásoló különböző anyagok kutatásai alapján az ösztrogén és a D₃-vitamin is PARP gátlószernek bizonyult (Virág 2002, Mabley 2007). Policisztás ovárium szindrómában ezideig nem történt meg a PARP aktivitás vizsgálata, illetve mérése.

4. Célkitűzések

1. A hiperandrogén állapot tanulmányozását tűztük ki célul a policisztás ovárium szindróma ismert modelljének alkalmazásával, és célkitűzésünk volt felmérni a klinikumban adjuváns terápiaként alkalmazott D₃- vitamin szerepét a kísérletes körülmények között.
2. Kísérletünkben az inzulinfüggő vazorelaxáció mértékének változásait akartuk megismerni a hiperandrogén állapotú aortagyűrűkön és D₃- vitamin alkalmazása mellett.
3. A PCOS hatására kialakult vazoreaktivitási, kontrakciós és dilatatív képesség változását terveztük nyomon követni Multi Miográf rendszer mérésekkel, az elemzéshez a két alapvető szabályozó rendszer; az NO- és prosztanoidfüggő hatások gátlásának segítségével alkalmazva.
4. Érdekelt bennünket, hogy a hiperandrogén környezetben az ösztrogén non genomikus, akut vazodilatatív hatása milyen mértékben érvényesülhet?
5. A vazoreaktivitási változásokra gyakorolt D₃-vitamin kezeléssel előidézett befolyást is szándékunkban állt megismerni.
6. Következő kérdésünk az volt, hogy PCOS-ben hogyan változik az erekben és más szövetekben a DNS reparációban nagy fontosságú PARP enzim aktivitása. PCOS-ben az aortafalban, a keringő leukocitákban és az ováriumokban tapasztalt károsodás mértékét radioimmunoassay segítségével poli(ADP)-ribóz festéssel mértük meg és így detektáltuk a PARP aktivitását. Ennek segítségével az egyes szövetek hiperandrogén állapot hatására bekövetkező károsodását mértük fel. A D₃-vitamin ismert PARP gátlószer.
7. A klinikai relevancia miatt azt is vizsgáltuk, hogy szükség esetén a D₃-vitamin a riboziláció mértékét képes-e csökkenteni?

5. Módszerek

5.1. A kísérletek során felhasznált kémiai anyagok és gyógyszerek

Kísérleteink során normál Krebs-Ringer oldatot használtunk, aminek az összetétele a következő volt: 119 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂·2H₂O, 1,17 MgSO₄·7H₂O, 20 NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄, 0,027 EDTA és 11 glukóz (Sigma-Aldrich), mM-ban mérve. A normál Krebs-Ringer oldatunk hőmérsékletét 37°C-on stabilizáltuk, és 5%-os CO₂-vel, és 95%-os O₂-vel áramoltattuk át. A használt normál Krebs-Ringer oldatunk pH értéke 7,4 volt. A noradrenalin (NA), az acetilkolin kloridot (ACh), a 17-béta ösztadiolt (E2), L-NAME-t és az indometacint a Sigma-Aldrich társaságtól szereztük be (St Louis, Missouri, USA, és Budapest, Magyarország). A NA-t, ACh-t, L-NAME-t fiziológiás sóoldatban oldva készítettük el a kívánt koncentrációkban frissen a felhasználás napján. A 17-béta ösztadiolt 70%-os alkoholban, és az indometacint NaHCO₃-ban oldottuk mindig frissen a felhasználás napján, a kívánt koncentrációban.

A D₃-vitamint, (1,25(OH)₂D₃-at), Calcijex injekció formájában használtuk melynek kiszerezése 2 mikrogramm/ml volt (Abbot, Illinois, USA).

A vizsgálatban használt Inzulin humán rekombináns Novo Nordisk eredetű volt, (Koppenhága, Dánia) Actrapid Penfill 100NE/ml- kiszerezésben használtuk.

A dihidrotesztoszteront (DHT) 7,5 mg-os pelletek formájában alkalmaztuk, amelyek folyamatosan, elhúzódóan, napi fix dózisban (83 µg/nap) anyagot bocsátottak ki. A származási hely: Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA.

Az anesztézia kialakítására pentobarbitált (Nembutal, Phylaxia Sanofi, Budapest, Magyarország) használtunk, a fertőzések kivédésére pedig a sebészi beavatkozást követően amoxicillint klavulánsavval (20+4mg) Augmentint, 0,2 ml fiziológiás sóoldatban oldva intramuszkulárisan adtuk be.

5.2. Az állatok és előkészítésük, a PCOS modell kialakítása

A vizsgálatunk ideje alatt mindent elkövettünk, hogy a beavatkozások minimális megterheléssel járjanak kísérleti állataink számára. Az állatok gondozása a teljes

kísérlet során megfelelt az Amerikai Egyesült Államok 2009-ben kiadott „Útmutató a Laboratóriumi Állatok Tartására és Kezelésére” szabályzat és a magyar Állatvédelmi Törvény ide vonatkozó utasításainak, amelyet az Intézményi Állatetikai Bizottság is elfogadott (22.1/2960/003/2009).

Vizsgálatunk alanyai a krónikus kezelés elején fiatal Wistar nőstény patkányok (21-28 napos) voltak (30 db). A Semmelweis Egyetem NET állatház és a Charles-River Ltd Budapest állománya volt. Élettani viszonyok között tartottuk őket, 12-12 órás nappali és éjszakai időszak váltakozásában, a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Humán és Kísérletes Élettani Intézetének állatházában. Az állatok normális patkánytápot kaptak tetszésük szerinti mennyiségben, és víz is ad libitum állt rendelkezésükre.

A kísérlet kezdetén a súlyuk 100-140 gramm volt. Három, egyenként 10-es létszámú random csoportot alakítottunk ki. PCOS-t modelláló DHT-s csoportot (n=10), DHT + D₃-vitaminos csoportot (n=10), és a kontrollokat (n=10).

A policisztás ovárium szindróma kialakítására a Manneras által javasolt és Yanes által megismételt metodikát alkalmaztuk (Manneras 2007, Yanes 2011). A patkányokat intramuszkulárisan adott 45 mg/kg Nembutal (pentobarbital) alkalmazásával, anesztéziában, steril körülmények között műtétnek vetettük alá. A tarkó felett ejtett bőrmetszést követően 20 állatnak folyamatos anyagkibocsátást biztosító dihidrotesztoszteron pelleteteket ültettünk be a nyak bőre alá (a=7,5 mg, 83 mikrogramm/nap), 10 patkányon pedig csak tarkómetszést hajtottunk végre, azaz álműtétet kaptak beültetés nélkül, ezek képezték a kontroll csoportot. A beavatkozást követően az ejtett sebést összevartuk. A DHT pelletet folyamatos anyagkibocsátó felépítéséből fakadóan a hormon folyamatos napi dozírózása biztosított volt, (napi 83 mikrogramm), aminek következményeként folyamatos hiperandrogenémiát tudtunk fenntartani. Ilyen kezelés hatására a tesztoszteron szint háromszorosára nőtt a kontrollokéval összevetve (Yanes 2011). A kezelést 10 héten át folytattuk, hogy a legkorábbi eltéréseket tudjuk detektálni.

A D₃-vitamin ellátást Przybylski javaslata szerint hajtottuk végre, kis módosítással. A dózist napi adagolás helyett heti egyszeri injekciókban kapták meg az állatok, a beavatkozással okozott stressz csökkentésének érdekében. Az adott mennyiség 120 mikrogramm/100 g volt testsúly szerint kiszámítva, heti egyszeri adagolásban szubkután injekció formájában (Przybylski 2010). Tíz patkány részesült az 1,25(OH)₂D₃

vitamin kezelésben (D₃-vitaminos csoport), miközben a tíz kontroll csoportbeli és tíz DHT-s állat fiziológiás sóoldat injekciót kapott. A vizsgálat ideje alatt sebési szövődményt nem észleltünk, fertőzés vagy egyéb megbetegedés sem volt.

5.3. Artériás vérnyomásmérés

Tíz héten keresztül folytatott DHT kezelés után direkt módon megmértük az artériás vérnyomást (a. carotis arterián keresztül), altatott patkányokon (pentobarbital, Nembutal 45 mg/kg i.m.). Maga a mérés a Cardiosys CO 104 Statham transzducerével történt (Experimetria, Budapest, Magyarország).

5.4. A torakális aortagyűrűk mintavétele és farmakológiai reaktivitásuk mérése

Az állat elaltatása után a mellkast megnyitottuk és felkerestük a szívcsúcsot. Azt megszűrva először vért vettünk az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz, majd heparinizált Krebs-Ringer oldatot áramoltattunk át a keringésen (10 ml, 10 NE heparin/ml = 100 NE heparin) az alvadékképződés elkerülése céljából. A heparinizálás után a szívet és az aortát kiperarálva eltávolítottuk. A torakális aorta disztális részét felkeresve minden állatból 8 db, egyenként 3 mm-es aortagyűrűt készítettünk, melyeket az előkészített, egyenként 8 ml normál Krebs-Ringer oldattal feltöltött, és 95% oxigen + 5% széndioxiddal (karbogén, Lindegas, Répcelak, Magyarország) folyamatosan levegőztetett, kellő mértékben buborékolatott érkádakba helyeztünk. A 3 mm-es aortagyűrűket igen finom csipesszel egyenként egy a Myograf rendszer (610-M Multi Myograph System; Danish Myo Technology, Aarhus, Dánia) kádjaiban található, egyenként 200 mikrométer átmérőjű rozsdamentes acélból készült értartó villákra húztuk fel. Ezt a felhúzást igen óvatosan, az endotélium épségének megőrzésére figyelve kellett elvégeznünk. A miográf szervkádjait előzőleg egyenként, 8 ml nKR oldattal töltöttük fel, és 37°C-ra melegítettük, ezen a hőmérsékleten stabilizáltuk is. A torakális aorta (TA) szegmenseket nyugalmi állapotban 15 mN-ra feszítettük elő, előzetes metodikai és egyéb tanulmányokat is figyelembe véve (Horváth B, 2005; Buday A, 2010) (5-6. ábra).

5. ábra: A Miográf központi egysége. A szervkádak, az erőmérő igazító csavarjai és a kijelző, amin a pillanatnyi feszülés mértékét olvastuk le mN-ban. (610-M Multi Myograph System; Danish Myo Technology)



6. ábra: A szervkádak felülről, az átburorékoltató csövekkel, és értartó villákkal.



Az aorta szegmensek működőképességének igazolására 124 mM K⁺-ot adagoltunk a kádakba a referencia kontrakció kiváltására. 20 perc elmúltával, a kádak kimosását követően 5 x 10⁻⁸M noradrenalin (NA) hoztunk létre prekontrakciókat és az endotélium relaxáló képességét (10⁻⁸-10⁻⁵M) acetilkolinnal teszteltük. A feszülés mértékét az MP100-as rendszerrel tudtuk szabályozni és mérni, míg a kiértékelést AcqKnowledge 3.7.3-as szoftverrel (Biopac System, Goleta, Canada) végeztük el. A koncentrációkat, a végső, a kádban mérhető töménységben adtuk meg. A vizsgálatok elvégzéséhez 8 kád állt rendelkezésünkre. Az ép endotéliummal bíró érgyűrűket a továbbiakban a következő vizsgálatoknak vetettük alá.

A/ Inzulin által kiváltott relaxáció

Az első négy kádban 5x10⁻⁸M NA-nal előidézett prekontrakciót követően növekvő dózisú inzulint adagoltunk a kádakba (50-150-300-600mU/ml) 15-15 perces különbséggel, és az inzulin által közvetített vazorelaxációt vizsgáltuk dózishatás görbék felvételével. A relaxáció mértékét százalékosan adtuk meg, az előzőleg a noradrenalin létrehozott prekontrakciók ellazításának mértékében. Ezt követően az aortagyűrűk felét, 10⁻⁴M indometacinnal (Sigma-Aldrich) és a másik felét 10⁻⁴M L-NAME-mel (Sigma-Aldrich) inkubáltuk 20-20 percen át, majd ismételtén az inzulin növekvő adagolásával elemeztük a dózis hatásokat. Az indometacinról tudjuk, hogy ciklooxygenáz gátló, a prosztanoidok szintézisét gátolja (a vazóaktív prosztanoidok közül a prosztaciklint és tromboxánt egyaránt) az L-NAME viszont a nitrogénoxid (NO) szintézisének gátlását biztosítja mindhárom szintáz működését bénítva (i-NOS, e-NOS, c-NOS), így a relaxáció hatásmechanizmusát közelebbről tudtuk vizsgálat alá vonni.

B/ A NA-ra és ACh-ra adott válaszreakciók

Az ötödik és hatodik kádban a 124 mM K⁺-os referenciakontra kció létrehozása után 5 x 10⁻⁸M NA-os prekontrakciókat hoztunk létre, és az érszegmensek ellazuló képességét, az endotélium épségét ACh lépcsőzetesen emelkedő dózisával regisztráltuk. Ezt követően noradrenalin lépcsőzetesen emelkedő dózisú (10⁻⁸-10⁻⁵M) adagolásával hoztunk létre dózishatás válszgörbéket és 10⁻⁵M NA-t a kádban hagyva ACh lépcsőzetesen emelkedő (10⁻⁸-10⁻⁵M) koncentrációjú adagolásával az érszegmenseket

relaxáltuk. Mindezekután az egyik kádat 10^{-4} M indomehtacinummal, míg a másikat 10^{-4} M L-NAME-val inkubáltunk 20 percen keresztül, és ez után ismételtük meg a dózishatás válaszgörbék felvételét a növekvő dózisú vazokonstriktor NA, majd vazorelaxáns ACh alkalmazásával.

C/ Ösztradiol adására bekövetkező válaszreakció

A hetedik és nyolcadik kádban az ösztrogénre adott válaszokat mértük, 10^{-5} M és 10^{-4} M koncentrációban a 5×10^{-8} M NA adásával prekontrahált érszegmenseken. Az egyes koncentrációk hatására 20 perces időintervallumot adtunk. Koncentráció-hatás görbéket vettünk fel, a relaxációk mértékét százalékban adva meg, a prekontrahált erek ellazulásának mértékében. A százalék számításhoz a következő képletet használtuk: $100 \times (\text{kontrakció-relaxáció}) / (\text{kontrakció-alapvonal})$.

5.5. Szövettani vizsgálat

A petefészkeket és az egyéb szöveteket a kivétel napján 4%-os formaldehidben fixáltuk a szövettani vizsgálatokhoz. A metszeteket haematoxin-eosin festéssel destettük meg és fénymikroszkópos vizsgálattal kerestük a PCOS szövettani jegyeit. Az aortafal vastagságát is szövettani vizsgálat során mértük le. Az értékeléshez Panoramic viewer szoftvert használtunk (3DHISTECH Ltd. Budapest, Magyarország).

5.6. Immunhisztokémia

Leukocitákat gyűjtöttünk a vénás vérből Histopaque-1083 (Sigma Aldrich, SYt. Louis, MO, USA) alkalmazásával. A sejtszuspenzióból metanolos fixációjú keneteket készítettünk. Az ovárium és aorta mintákat formalinnal fixálva paraffinba ágyztuk és 5 mikrométer vastag szeleteket készítettünk.

Deparaffinizáció és antigen feltárás után (0,1 mmol/l citrate puffer, pH3, mikrohullámmal 15 percen át melegítve) monoklonalis egér anti-PAR antitesttel (Calbiochem, San Diego, CA, USA), egy éjen át kezelve, 1:1.000 arányban 4 fokos hőmérsékleten a poly(AdenosinDiPhosphate-Ribose) (PAR) került kimutatásra. A másodlagos jelölést biotinizált egér ellenes ló antitesttel (Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA) érték el szobahőmérsékleten 30 perc reakcióidővel. Torma peroxidázzal conjugált avidint adva hozzá (30 percig szobahőmérsékleten) valamint nikkellel felerősített diaminobenzidint (DAB) (szobahőmérsékleten, 6 percen át, fekete szín) használtunk a jelölés vizualizálására (Vector Laboratories).

A szövettani anyagok és a kenetek háttérfestésére céklalét használtuk. A sejtmagokat nuclear fast red-del tettük láthatóvá.

5.7. A PAR-festett kenetek kiértékelése

A poli (ADP-ribóz) festett kenetek kiértékelésére, a PAR aktivitás jellemzésére szemikvantitatív pontozásos skálát alkalmaztunk. A festett keneteken látottakat, 1-10ig értékelve az adott látóterek látványát független vizsgáló által. (1: nincs festődés; 2: enyhe citoplazmatikus festődés; 3: erős citoplazmatikus festődés; 4: citoplazmatikus festődés néhány pozitív sejtmaggal; 5: körülbelül a sejtmagok 50%-a pozitív festődésű, 6: körülbelül a sejtmagok 75%-a pozitív; 7: általános magfestődés néhány negatív sejttel; 8: minden sejtmag pozitív; 9 erős magfestődés minden sejtben; 10-es fokozat: igen erős általános magfestődés minden sejtben (Horváth E és mtsai 2009). A festődés pozitivitását független vizsgáló értékelte a fenti 10-es skála használatával, ennek megkönnyítésére egy táblázatot használtunk (2. táblázat) majd ezen eredményeket grafikailag is ábrázoltuk.

2. táblázat: Útmutató a PAR festődés kiértékeléséhez

Pontérték	Festődés
1	szórványos, halvány citoplazma
2	25% alatt
3	25-50% közötti szemcsés
4	25-50% közötti teljes
5	50-75% közötti szemcsés
6	50-75% közötti teljes
7	75-90% közötti szemcsés
8	75-90% közötti teljes
9	90% felett szemcsés
10	90% felett teljes

5.8. Statisztikai módszerek

A dózis-hatás görbéket repeated measures ANOVA-val, az egyéb, különálló paramétereket egy-utas (one way) ANOVA (analysis of variance) számításokkal értékeltük ki. Post hoc tesztként a Newman-Keul's tesztet végeztük el. Szignifikánsnak egyöntetűen a $p < 0,05$ eredményeket fogadtuk el. Az adatokat mindig az átlag \pm szórással adtuk meg.

A szignifikancia jelölésére az ábrákon és táblázatokban egységesen a következő jelrendszert alkalmaztuk: csillag (*) jelöli, ha a kontroll cs. versus DHT cs. között volt szignifikáns a különbség; egyes kereszt (†) jelöli, ha a kontroll cs. versus DHT+D₃ között volt szignifikáns különbség; kettős kereszt (‡) jelöli, ha a DHT cs. versus DHT+D₃ cs. között volt szignifikáns a különbség. Amikor a szignifikancia mértéke nagyságrenddel nagyobb volt, mint $p < 0,05$; azt külön jeleztük.

6. Eredmények

6.1. Az állatok testsúlya, vérnyomása és az aortafal vastagságok

Az állatok testsúlya a 10 hetes kísérleti periódus végére a két DHT csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll csoportban. Kontroll: 298,2±8 gramm, DHT:353,9±15,8gramm, DHT+D₃: 354±8,7gramm. (3. táblázat p<0,05 a kontroll vs. DHT és a kontroll vs. DHT+D₃). Az állatok artériás középnyomása a carotis artérián keresztüli direkt vérnyomás mérés eredményei szerint 10 hetes vizsgálati időszak végén nem különbözött egymástól szignifikánsan (kontroll: 121,7± 3,2 Hgmm, DHT: 123,4± 5,6 Hgmm, DHT+D₃: 122,5± 3,9 Hgmm).

Az aorta fal vastagság kontroll: 113±4µm, DHT: 122±5µm, DHT+D₃: 113±6µm. A különbség egyik összehasonlításban sem szignifikáns. (3. táblázat)

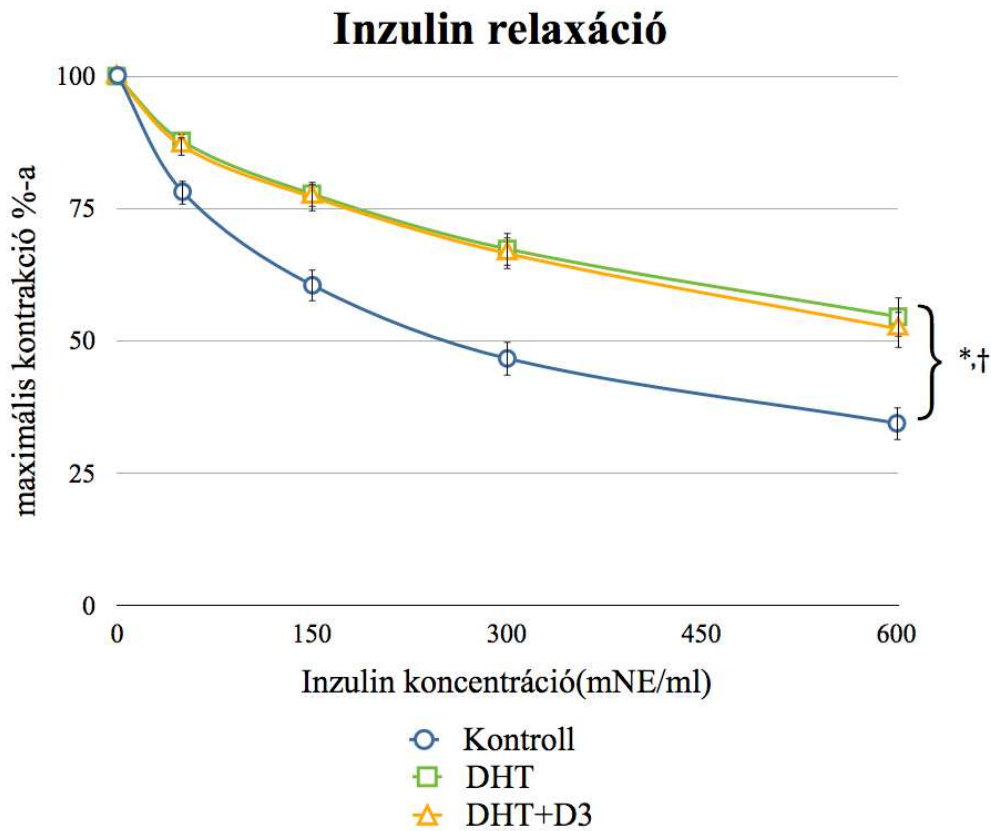
3. táblázat: A kísérlet 10 hetes vizsgálati időtartama után mért testsúly és vérnyomás adatok, valamint az aortafal vastagságok

adatok (mértékegység)	kontroll csoport	DHT kezelt csoport	DHT+D ₃ kezelt csoport
testsúly (gramm) (*, †)	298,2±8	353,9±15,8	353,4±8,7
artériás középnyomás (gramm) n.s.	121,7±3,2	123,4±5,6	122,5±3,9
aorta fal vastagság (mikrométer) n.s.	113±4	122±5	113±6

6.2. A hiperandrogén állapot és a D₃-vitamin hatása az inzulin által létrehozott relaxációra az aortagyűrűkön

Az inzulin által kiváltott direkt érhatás relaxáció formájában nyilvánul meg. A relaxáció szignifikáns mértékben kisebb volt a DHT kezelt állatokban, mint a kontrollokban (8. ábra), a p<0,05 volt a kontroll cs. és DHT csoport, illetve a kontroll csoport és DHT+D₃ csoport között mérve. A D-vitamin kezelés a relaxációt nem befolyásolta.

7. ábra: Az inzulin által létrehozott relaxációk



Az ábrán az emelkedő inzulin koncentrációk által a patkány aortagyűrűkön létrehozott relaxációs hatást látjuk; a kontroll csoportét, a DHT-val kezeltét és a DHT+D₃ vitaminos kezeltét.

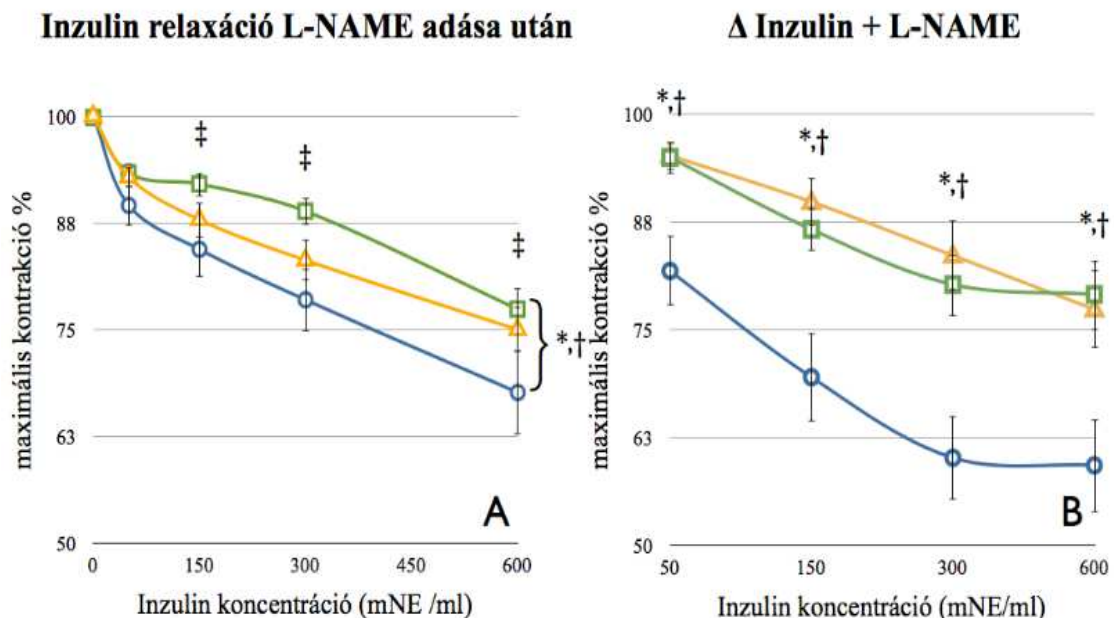
A relaxáció mértékét az 5×10^{-8} M noradrenalinnal létrehozott maximális prekontrakció százalékaival jelöltük (ordináta). Az abszcisszán az alkalmazott inzulin koncentrációk láthatók. Az egyes jelölések mindig az átlagértéket \pm szórást jelölik a 40 aorta gyűrűn mért adatokból ($p < 0,05$). A kontroll és DHT csoport között (*), a kontroll csoport illetve a DHT+D₃ között (†). A két dihidrotesztoszteron csoport között nincs szignifikáns különbség.

Méréseink arra utaltak, hogy az inzulin által kiváltott (az aortagyűrűn kimutatott) relaxációt a dihidrotesztoszteron kezelés csökkentette/gátolta, amit a D₃- vitamin párhuzamos alkalmazása nem befolyásolt.

Az L-NAME inkubáció szignifikánsan csökkentette az inzulin által kiváltott relaxációs képességet a kezeletlen nőstény patkányok aortagyűrűin (kontrollok). A DHT-val kezelt

állatok inzulin relaxációja is csökkent L-NAME inkubációt követően, a kezeletlenekkel összehasonlítva viszont szignifikánsan kisebb a relaxáció mértéke a teljes dózistartományban (8. ábra A panel) $p < 0,01$ a kontroll és a DHT-s között, $p < 0,05$ a kontroll és a DHT+ D₃ között. A D₃ vitamin előkezelés azonban korrigálta az elvesztett relaxáló képességét az érgyűrűnek az inzulin nagyobb koncentrációinál, (150-600 mNE/ml inzulin cc), amint ez a 8. ábráról le is olvasható $p < 0,05$ a DHT vs. DHT+D₃, a 150-600-as inzulin dózistartományban.

8.ábra: Az inzulin által létrehozott relaxációk mértéke az L-NAME inkubációt követően



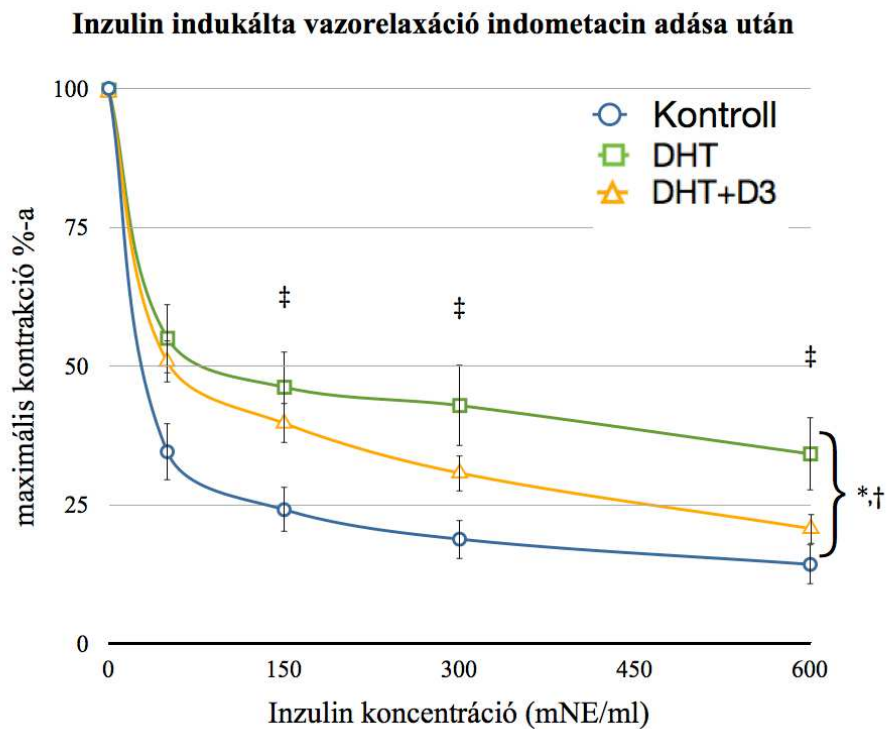
A. Az L-NAME-mel inkubált érszögmenyek inzulin emelkedő dózisa mellett létrejövő relaxációs görbéi.

B. Az NO függő relaxációkat, az L-NAME adása előtti és utáni inzulin relaxáció különbségeket kiemelten ábrázolja.

A 8/B ábrán a delta (ami az egyes inzulin koncentrációknál az L-NAME előtti és az L-NAME behatás után állapot különbségét jelzi) ábrázolással kiemelten látjuk az NO függő részét a relaxációnak a különböző inzulin koncentrációknál. Mindkét DHT-val kezelt csoport minden koncentrációnál szignifikánsan különbözik a kontroll csoporttól $p < 0,01$, de nincs különbség a DHT és a DHT+D₃ csoport között.

Indometacinnal (10^{-4}M) inkubált aorta gyűrűk az inzulin emelkedő dózisára bekövetkező relaxációja a kontroll csoporttal összevetve szintén csökkent (9. ábra) méghozzá szignifikáns mértékben. A D_3 -vitamin-kezelés mellett a relaxáció képesség sokkal inkább megőrzött volt ($p < 0,05$).

9. ábra: Az inzulin által létrehozott relaxációk indometacinnal történt inkubációt követően



Relaxáció, amely az inzulin emelkedő koncentrációja mellett jött létre indometacinnal történt előkezelés után.

A kontroll állatok aortagyűrűiben szignifikánsan nagyobb volt a relaxáció, mint a DHT-val kezeltékében a teljes dózistartományban ($p < 0,05$), kontroll vs. DHT és kontroll vs. DHT+D₃) Az inzulin 150-300 és 600 mNE/ml dózisainál a D-vitaminos csoportbeli aortagyűrűk relaxációja a DHT-val kezeltékétől is szignifikánsan különbözött, vagyis nagyobb volt a relaxáló kapacitás ($p < 0,05$).

Azt láthatjuk, hogy a D-vitamin itt is korrigálta a relaxáló képességét, mivel a DHT vs. DHT+D₃ görbék egyes pontjainak eltérése is szignifikáns, az inzulin nagyobb dózisainál, a 150 mNE/ml inzulintól felfelé növekvő koncentrációknál.

6.3. A D₃-vitamin hatása hiperandrogén nőstény patkányokban az aortagyűrűk farmakológiai reakcióira

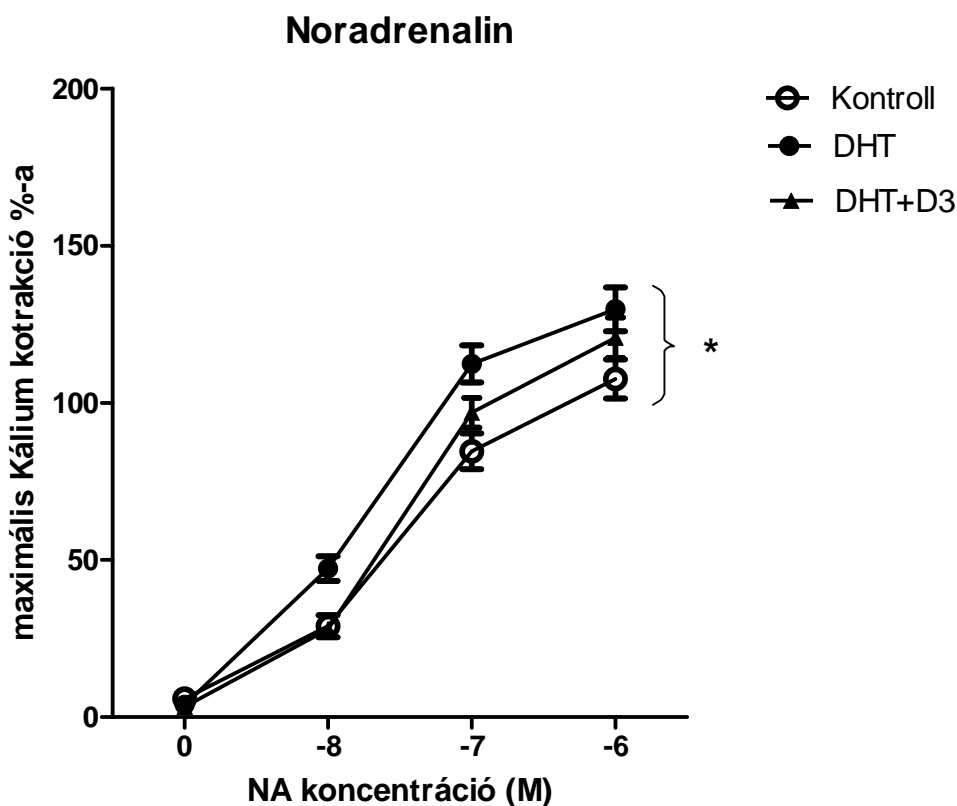
6.3.1. Referencia érválaszok

A referencia kontrakciókat 124 mM K⁺-mal váltottuk ki, majd ismét normál Krebs-Ringer oldatban 20 perc inkubációt követően 5×10^{-8} M noradrenalin (NA) prekontrakciót hoztunk létre, és az endotélium épségét emelkedő dózisú acetilkolin (10^{-8} - 10^{-5} M ACh) adagolásával teszteltük. Ezt követően végeztük el az alább tárgyalt vazoreaktivitási vizsgálatokat, mindhárom terápiás csoport érgyűrűi esetében.

6.3.2. Vazokonstriktor válaszok. Noradrenalin által létrehozott kontrakciók

Az emelkedő dózisú NA adásával létrehozott érkontrakciók (NA 10^{-9} - 10^{-6} M), a dihidrotesztoszteronnal kezelt állatokban erőteljesebbek voltak, különösen nagyobb koncentrációk esetében ($p < 0,05$; 10.ábraA D₃-vitaminnal kezelt állatoknál ez a kontrakció fokozódás valamelyest mérsékeltebb volt (n.s.).

10. ábra: Kontrakciók noradrenalin emelkedő dózisu adagolása mellett

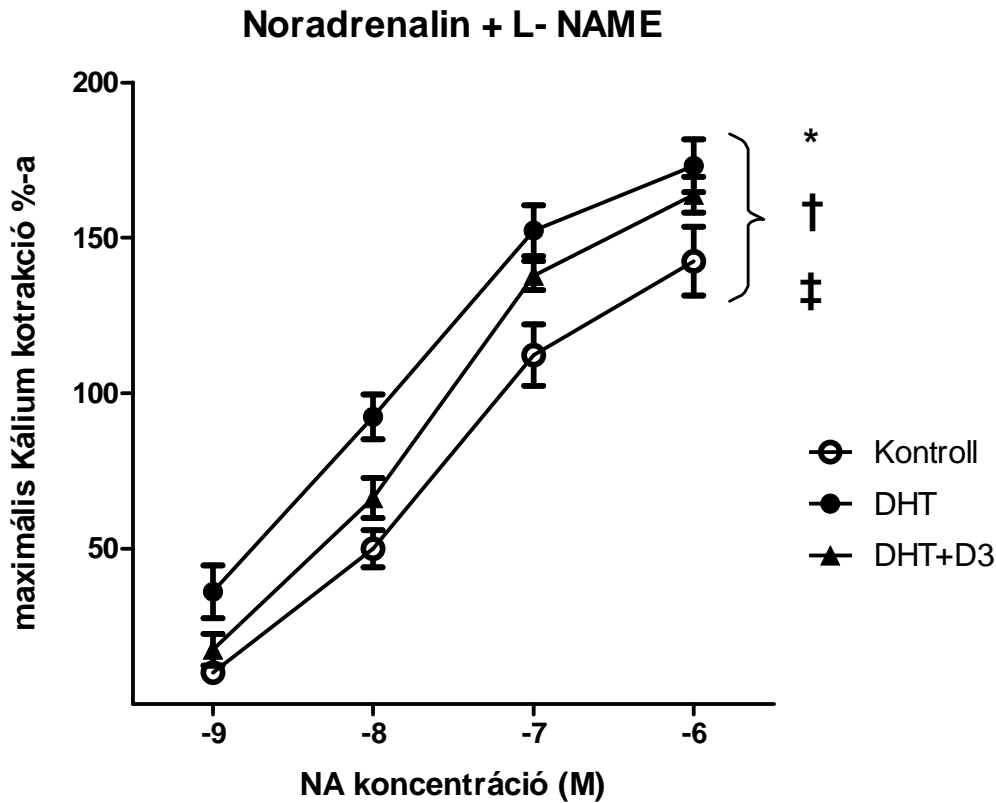


A 10. ábrán a noradrenalin 10^{-9} - 10^{-6} M emelkedő dóziséra bekövetkezett kontrakciós válaszokat ábrázoltuk.

6.4.2.1. Az L-NAME előkezelés hatása a vazokonstriktor érválaszokra

Az L-NAME előkezelést követően kiváltott noradrenalinus kontrakciók DHT-s állatokban még jelentősebb növekedést mutattak a kontrollhoz képest, mint L-NAME előkezelés nélkül ($p < 0,0001$ kontroll vs. DHT). A D_3 -vitamin ezt mérsékelte, még hozzá szignifikáns mértékben. A D_3 -vitamin kezelt érzegmensek L-NAME jelenlétében felvett NA kontrakciós görbéje a kontroll és a DHT csoportok dózishatás görbéi között fut, és mindkettőtől szignifikáns mértékben különbözik ($p < 0,05$ kontroll vs. DHT+ D_3 , és DHT vs. DHT+ D_3) (11. ábra).

11. ábra: L-NAME előkezelést követő kontrakciós görbék



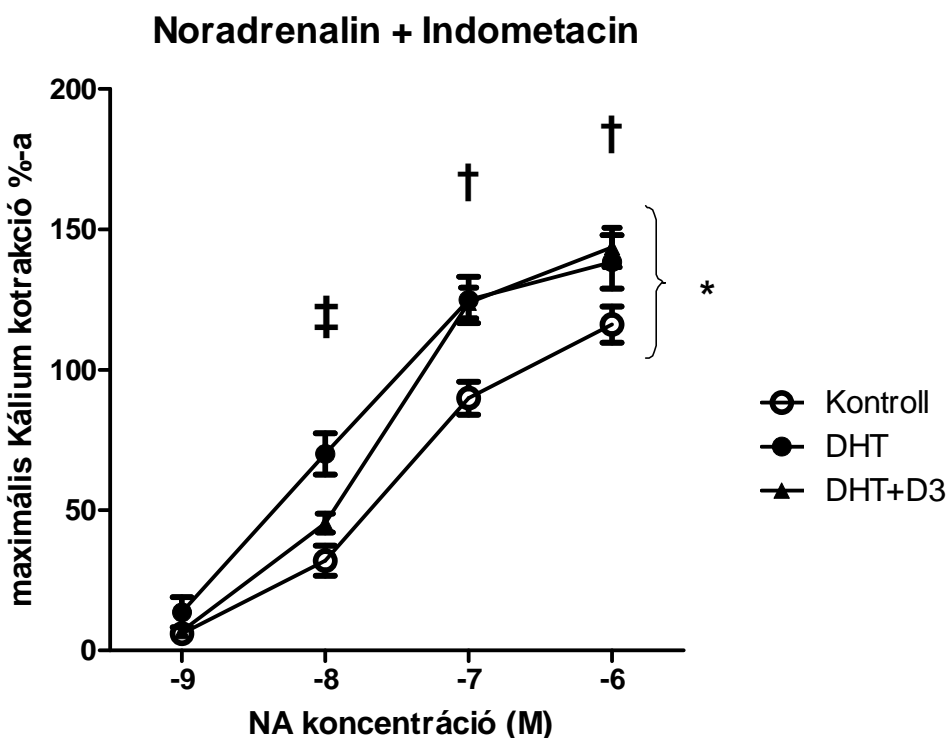
Az ábrán az L-NAME inkubációt követő kontrakciók láthatók. Az abszcisszán a noradrenalin emelkedő dózissai, az ordinátán a kontrakció mértéke a maximális K^+ -prekontrakció %-ban kifejezve (kontroll vs. DHT $p < 0,0001$), ($p < 0,05$ kontroll vs. DHT+D₃, és DHT vs. DHT+D₃).

6.4.2.2. Indometacin előkezelést követő vazokonstriktív válaszok

A DHT-val kezelt állatokból származó aortaszegmensek kontrakciói az indometacinos előkezelést követően szintén szignifikáns mértékben erősebbek lettek a kontrollokhoz viszonyítva az egész dózistartományban ($p < 0,05$). A D₃-vitaminnal kezelt állatok aortagyűrűin a noradrenalin kisebb dózisaiknál (10^{-9} - 10^{-8} M) a D₃-vitamin szignifikáns módon meggátolta ezt a kontrakció fokozódást, de a nagyobb dózisú noradrenalin hatásainál már nem tudta ezt biztosítani. Az kisebb koncentrációknál a DHT+D₃ görbe a kontroll csoporttal együtt fut, és szignifikáns mértékben különbözik a DHT-s

görbétől ($p < 0,05$), azonban a nagy dózisu NA koncentrációknál a D₃-vitaminos görbe a DHT-sel egyezik, és a kontrolltól különbözik szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) (12. ábra).

12. ábra: Indometacin előkezelést követő kontrakciók



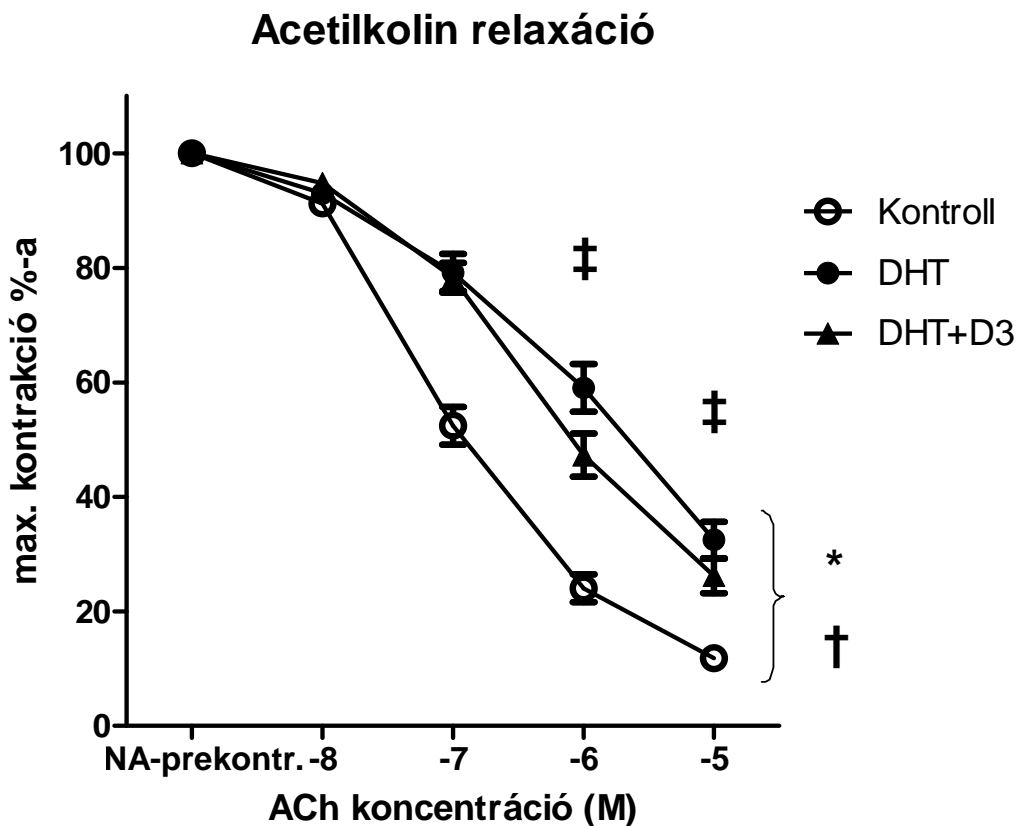
Az ábra az aortagyűrűk indometacinnal történt előkezelése utáni noradrenalin kiváltott kontrakcióit mutatja. A dihidrotesztoszteronnal kezelt állatokból származó érgyűrűk kontrakciós képessége jelentősen megnőtt az egész dózistartományban $p < 0,05$ kontroll vs. DHT. A D-vitamin kezelés részben meggátolta ezt a kontrakció növelést.

6.4.3. Az acetilkolinnal kiváltott vazodilatációs válaszok modellünkben

A vazodilatációt a NA dózishatás görbe utolsó lépcsőben 10^{-6} M noradrenalinral kontrahált érszakaszokon vizsgáltuk. A kumulatív, emelkedő dózisu acetilkolinnal (10^{-8} - 10^{-5} M) kiváltott relaxációs válaszban a kontroll csoportból származó aorta érszakaszok a teljes dózistartományban nagyobb relaxációra voltak képesek, mint a DHT-val kezelt állatokból származó aortaszegmensek. A különbség szignifikáns volt

minden acetilkolin dózisa bekövetkezett ellazulási képességben ($p < 0,05$). Az acetilkolin nagyobb dózisainál a D-vitaminnal kezelt állatok érszakaszainak ellazulási képessége közelít a kontrollokéhoz, de a szignifikáns mértéket csak a két legnagyobb dózis (10^{-6} - 10^{-5} M) esetében éri el a DHT-s csoporttól való különbözőségben (13. ábra).

13. ábra: A torakális aorta szegmensek relaxációs képessége a 10^{-6} M noradrenalin prekontrakció követően



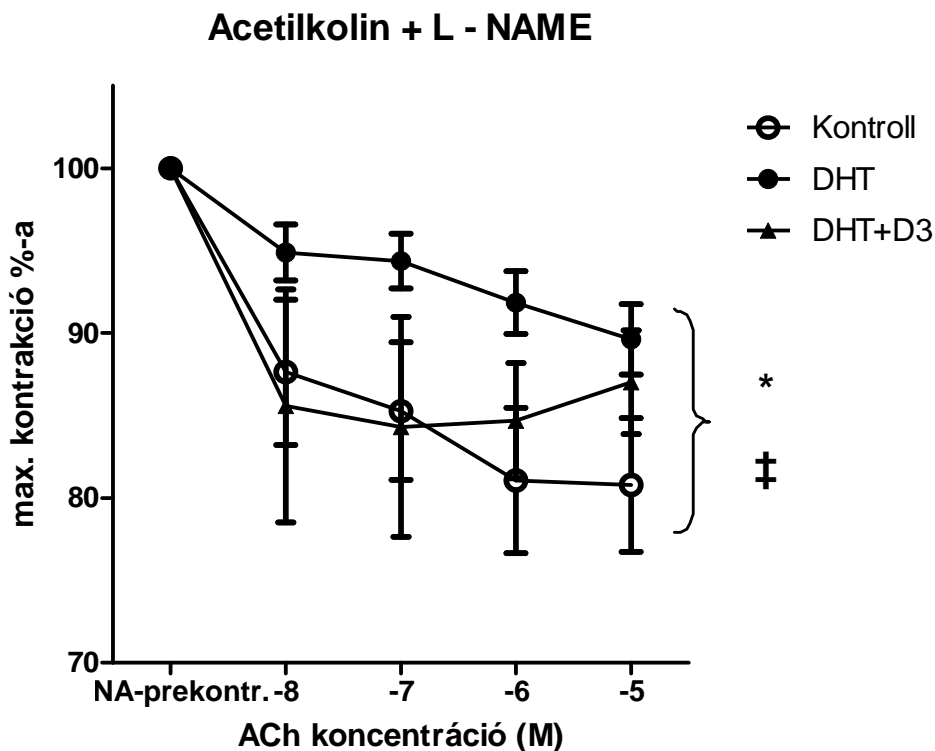
Az aortagyűrűk noradrenalinval létrehozott prekontrakció utáni acetilkolinnal kiváltott relaxációs képessége. A két nagyobb dózis mellett ($p < 0,05$ DHT vs. DHT+D₃), a teljes dózistartományban ($p < 0,05$ kontroll vs. DHT, kontroll vs. DHT+D₃).

6.4.3.1. A vazodilatációs válaszok L-NAME előkezelést követően

Az L-NAME-mel előkezelt érszegmenseken az acetilkolin relaxációk szignifikáns mértékben csökkent. Az L-NAME jelenlétében fennmaradó relaxáció mértékében

szignifikáns különbség volt a kontroll és a DHT között, a DHT esetében ez jóval kisebb volt. A D₃-vitamin adagolása normalizálta az NO-independens ACh relaxáló képességet, mint ezt a 14. ábrán látjuk. A dihidrotesztoszteron kezelést kapott állatok aortagyűrűi az egész dózis tartományban szignifikáns mértékben ($p < 0,01$) kevésbé voltak képesek relaxálni mint a kontroll, vagy akár D-vitamin kezelésben részesült állatok aortagyűrűi. A teljes dózistartományban szignifikáns differencia látszik a DHT és a kontroll, illetve a DHT és a DHT+ D₃- vitamin között.

14. ábra: L-NAME-mel történt előinkubációt követő acetilkolin emelkedő dózisára adott válaszreakciók

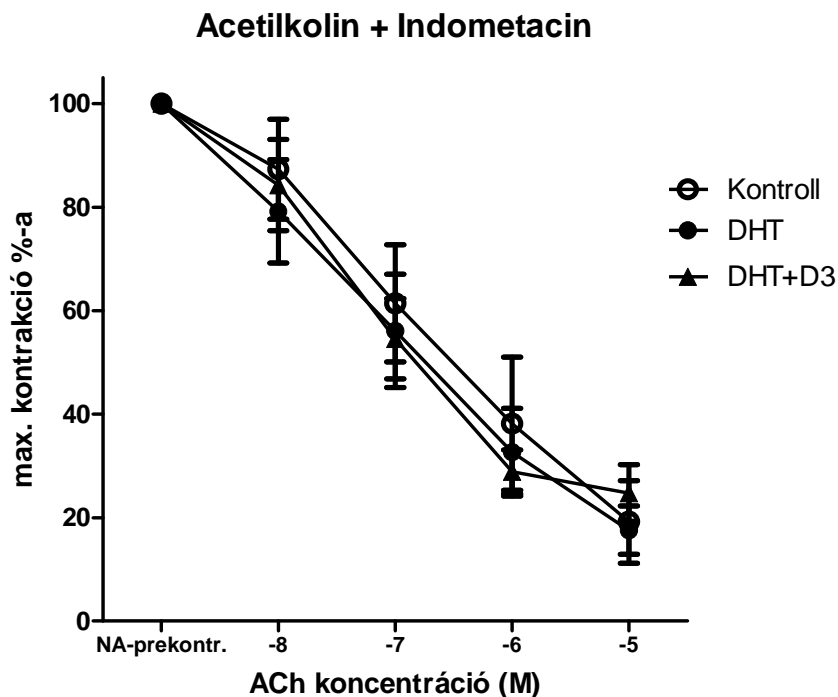


Az L-NAME-mel való előinkubációt követő relaxálóképesség. Az abszcisszán a relaxációt a NA-nal elért maximális kontrakció százalékában látjuk, az ordinátán pedig az acetilkolin emelkedő dózisait (10^{-8} - 10^{-5} M).

6.4.3.2. Indometacin előkezelést követően vizsgált acetilkolin emelkedő dózisára adott válaszreakciók a NA-nal prekontrahált érszegmenseken

Az indometacinnal előkezelt érgyűrűkön mért relaxációs kapacitást vizsgálva azt láttuk, a kontroll, a DHT-s és a DHT + D₃ -vitaminnal kezelt állatokból származó érszegmensek relaxáló képessége megegyező. A három görbe gyakorlatilag együtt fut, vagyis nincs különbség a relaxációs képességben (15. ábra).

15. ábra: Indometacinnal előkezelt aorta szegmensek relaxációja az emelkedő dózisú acetilkolin hatására



Az acetilkolinra adott relaxációs válaszok láthatók indometacin előkezelést követően.

6.5. Az ösztradiol által kiváltott akut vazorelaxáció

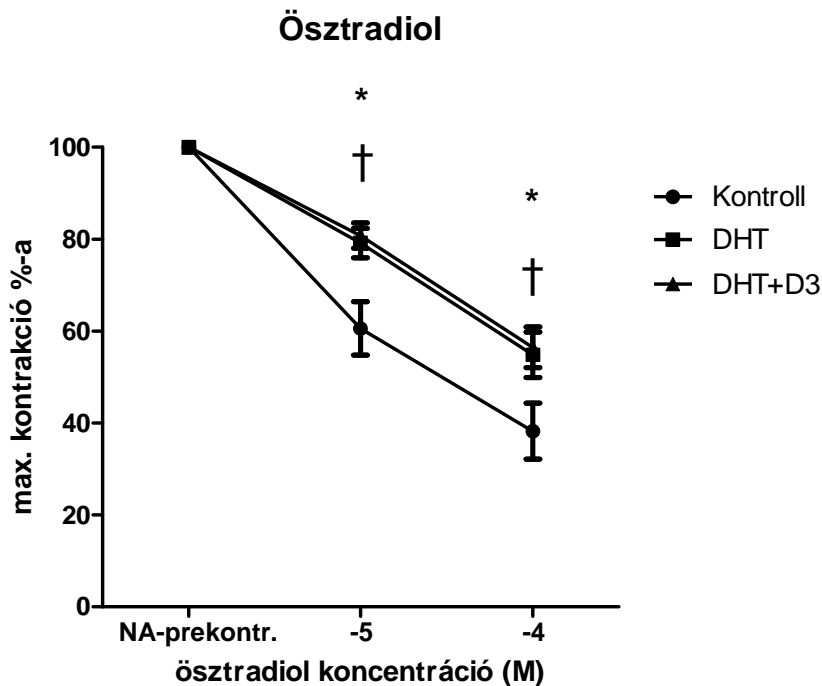
Fiziológiás E₂ (10⁻⁵-10⁻⁴M) adására a kontrahált állapotú torakális aortagyűrűk relaxációba kerültek. A kontrakciót az előzőekhez hasonlóan 5x10⁻⁸M noradrenalin

hatásával hoztuk létre. A relaxáció mértékét a maximális kontrakció százalékában fejeztük ki a következő számítás alapján: % relaxáció = $100 \times (\text{a NA utáni kontrakció} - \text{az E}_2 \text{ adás utáni kontrakció}) / \text{a NA által okozott kontrakció} - \text{a bazális tónus}$.

A különbség a kontroll csoport és a DHT csoportok között szignifikáns volt ($p < 0,01$), valamint a kontroll illetve a DHT+D₃-vitaminos csoport között is ($p < 0,01$). A DHT és DHT+D₃-vitaminos csoport között nem volt szignifikáns a különbség.

A legnagyobb relaxációt a kontroll csoportban értük el, a DHT-vel kezelt állatokból származó aortagyűrűk relaxáló képessége csökkent volt a kontroll csoportéhoz képest ($p < 0,01$) az ösztrogén hiperandrogén környezetben kevésbé tudta a relaxáló hatását kifejteni (16. ábra). Az E₂ relaxáló képességét a DHT kezelés szignifikánsan ($p < 0,01$) csökkentette, erre a D₃ vitaminnak nem volt hatása.

16. ábra: Az ösztrogén hatására bekövetkezett vazorelaxációk az 5×10^{-8} NA hatására maximálisan kontrahált érszakaszok százalékos arányában

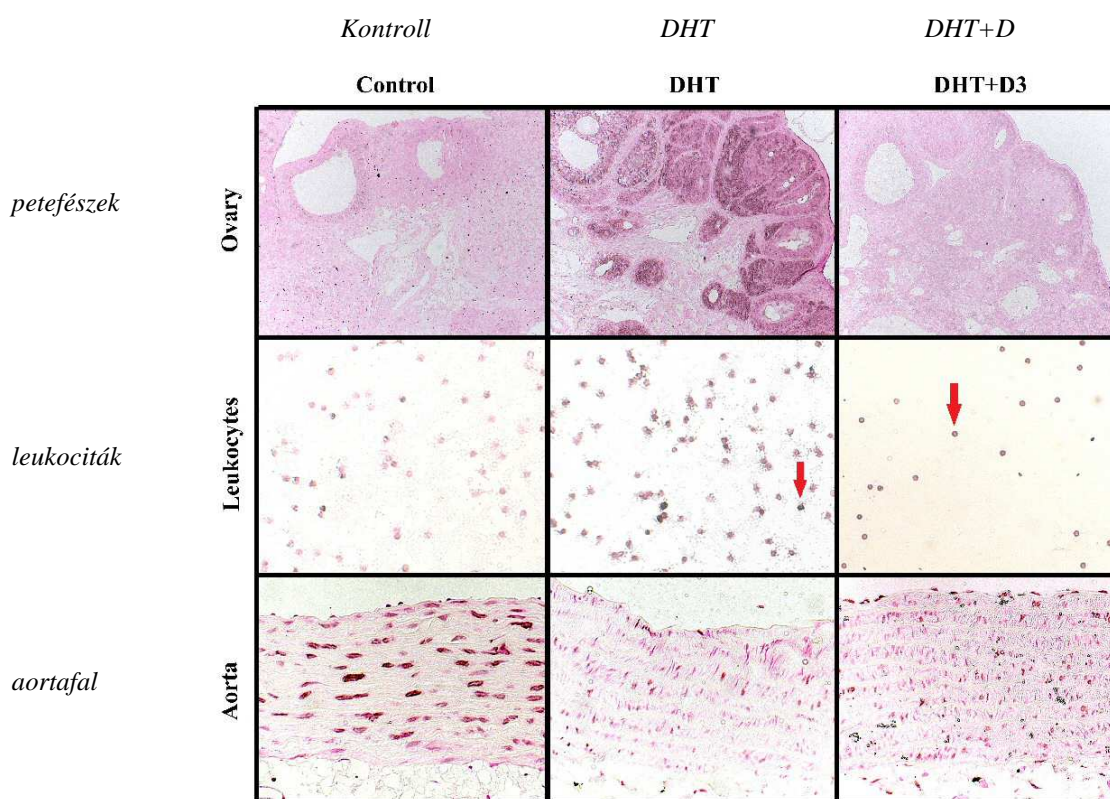


Az ábrán az ösztrogén 10^{-5} - 10^{-4} M koncentrációban kiváltott relaxációs kapacitását láthatjuk a kontroll csoport, a DHT-vel kezelték és a DHT+D₃-vitaminnal kezelték torakális aortagyűrűin.

6.6. Dihidrotesztozteron és D₃-vitamin hatása a PARP enzim aktivitására a különböző szervekben és szövetekben

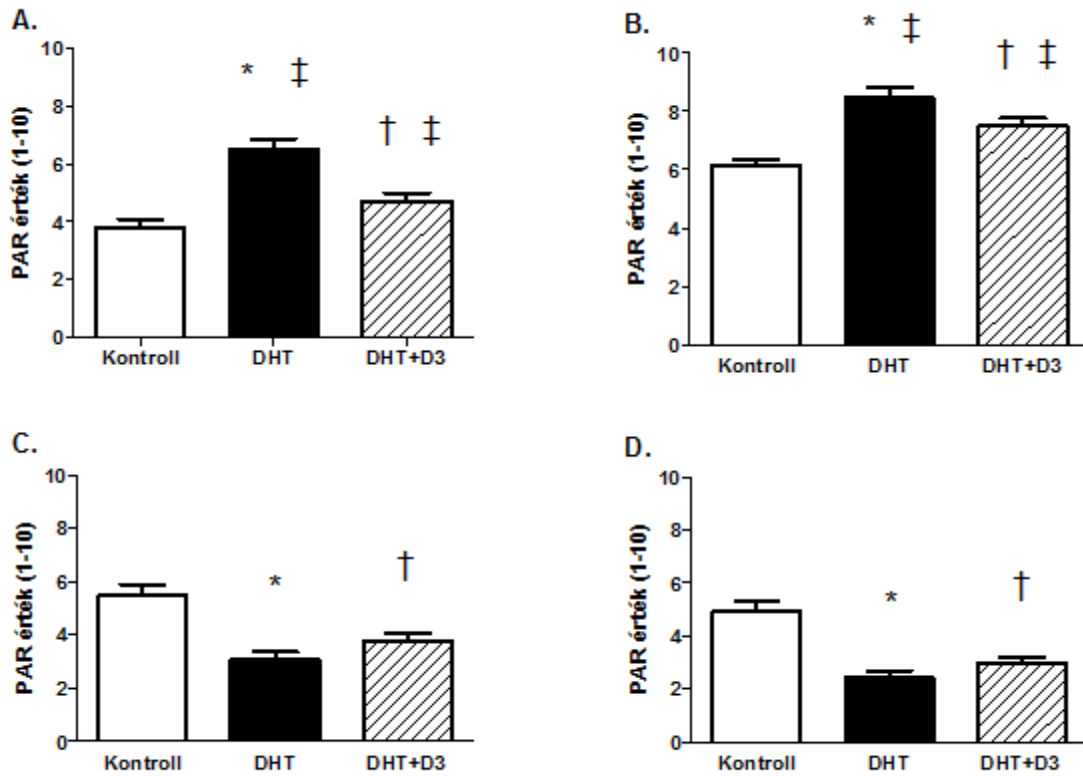
Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye kimutatta, hogy a legerőteljesebb PARP aktivitás a dihidrotesztozteronnal kezelt állatok ováriumában és a leukocitákban volt kimutatható, ugyanakkor a D₃-vitamin kezelés szignifikáns mértékben csökkentette ezt (17. ábra; 18. A és B ábra).

17. ábra: A PAR festődés szövettani képei



A szövetrészeket és a leukocita keneteket anti PAR antitesttel jelöltük meg. A pozitív szövetek és sejtek a sötét különböző tónusaiban láthatók a festődési intenzitásnak megfelelően. Háttérfestésnek vörös színű céklalét használtunk. A nyilakkal a pozitívan festődő magokat jelöltük.

18. ábra: A PAR festődés intenzitásának eltérései a három vizsgált csoportban, különböző szövetekben. A ováriumban, B leukocitákban, C aorta endotéliumban, D aorta simaizomsejtjeiben



A PAR festődés különböző szövetekben és sejtekben. A jelzés az előbbiekhöz hasonlóan a következő: * = kontroll és DHT között $p < 0,05$, † = kontroll és DHT+D₃-vit. között $p < 0,05$, és ‡ = a két DHT-s csoport közötti szignifikáns különbséget jelöli $p < 0,05$.

Az ováriumokban és a keringő leukocitákban a PCOS-ben kifejezett a PAR-festődés amelyet a D₃-vitamin kezelés érdemben változtatott meg, azt szignifikánsan csökkentette (18. A és B ábra). Ettől eltérően az aorta endotéliumban és simaizomsejtjeiben a DHT kezelés mellett csökkent PAR festődést találtunk melyet a D₃-vitamin terápia nem befolyásolt (18. C és D ábra).

7. Megbeszélés

Kísérleteinkben policisztás ovárium szindróma modellezésével hiperandrogén állapotot hoztunk létre fiatal nőstény patkányokban. Kivitelezéséhez a Manneras és mtsai. által leírt modellt alkalmaztuk. Manneras és munkatársai bizonyították, hogy ez a DHT kezelési séma a PCOS adekvát modellje patkányokon (Manneras 2007). Ismert, hogy 8-12 hetes, az általunk alkalmazottal azonos DHT kezeléssel a patkány petefészkeken policisztás jellegű elváltozások jönnek létre, és az androgén szintek is szignifikánsan (háromszorosra) emelkednek (Manneras 2007, Yanes 2011). Az ováriumok policisztás elváltozását mi is kimutattuk (17. ábra), ami egyben azt is igazolja, hogy sikerült a humán betegséghez hasonló PCO szindrómát kiváltanunk.

7.1. Inzulin

Elsőként az inzulin vazorelaxáló képességét teszteltük. Az inzulin NO-függő vazorelaxációs képességét és hatását többek között Scherrer már 1994-ben az alkar verőereinek vizsgálata során kimutatta azt is feltételezve, hogy ez a szisztémás vérnyomás szabályozásában is szerepet játszhat (Scherrer 1994). A későbbiekben került ismertetésre ennek celluláris hatásmechanizmusa, mely nagyjából a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) által aktivált endotheliális NO (e-NOS) szintáz működése alapján valósul meg (Muniyappa R 2007). Contreras és mtsai 2011-ben obez és sovány Zucker patkányok koszorúerein mérték meg az inzulin dilatáló képességét és mikrovaszkuláris miográf révén igazolták, hogy a nitrogénoxid e-NOS által közvetített vazorelaxáns hatása koszorúerekben inzulinrezisztencia esetében is működik (Contreras 2011). Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy D₃-vitamin kezelés korai PCOS modellben kivédte a dihidrotesztoszteron adagolás által kiváltott szisztémás hyperinzulinémiát és inzulin rezisztenciát. Az OGTT során mért 2 órás inzulin értéke a DHT kezeltékben közel háromszoros volt a kontrollokénak. D₃-vitamin pótlás teljes mértékben korrigálta ezt az eltérést (Sára 2012).

Elsőként mutattuk ki patkány aortán a PCOS szindróma modelljében, hogy dihidrotesztoszteron kezelés következtében csökken az inzulin relaxációs képessége

aortán. Ezt az elváltozást az inzulin rezisztencia vaszkuláris formájának tekinthetjük. A hiperandrogén állapot okozta vaszkuláris inzulin rezisztenciát – szemben a szisztémással – a D₃-vitamin kezelés érdemben nem befolyásolta (7. ábra). Hasonló eltérést a szisztémás/metabolikus és vaszkuláris inzulin rezisztencia között már (Schulman 2007) is detektált a korosodással összefüggésben. A D-vitamin hatására a kis és nagy ereken (arteriola és aorta) különböző válaszreakciót észleltünk. Munkacsoportunk korábbi kísérletei során azt tapasztalta, hogy a kisereken a D-vitamin kezelésnek protektív hatása volt az inzulinfüggő relaxáció szempontjából (Sára 2012) és az a szer a szisztémás inzulin rezisztenciát is ki tudta védeni. Jelen vizsgálatunkban a D-vitamin a DHT kezeléssel károsított relaxációs kapacitást nem tudta kijavítani. Úgy gondoljuk, hogy ennek az eltérő jelenségnek a magyarázata ugyanannak a mechanizmusnak a kis- és nagy ereken különböző dominanciával történő megjelenése lehet. Az inzulin indukálta vazorelaxáció legfőbb mechanizmusa az NO út aktiválásán keresztül történik (Kim 2012). Kutatásunk során is igazolást nyert ez a tény, hiszen az L-NAME hatása alatt mért vazorelaxációknál az aortaszegmensek ellazuló képességének csökkenését tapasztaltuk. Így mi is megállapíthattuk, hogy aortán az inzulin vazorelaxáns hatása nagyrészt NO-függően jelentkezik.

Dihidrotesztoszteron kezelést követően az NO-reakcióút L-NAME blokkolása mérsékelten csökkentette a relaxációt. Ugyanakkor a kontrollokhöz képest a különbség csökkent, de szignifikáns maradt. Tehát a DHT kezelés elsősorban az NO-függő relaxáció károsodása révén okozta az inzulinfüggő relaxáció csökkenését. Mivel a relaxációs hatások között NO-blokkolást követően is mérhető még különbség, valószínűleg más vazorelaxációs mechanizmust is gátol a dihidrotesztoszteron. D₃-vitamin kezelést követően az NO-gátlás közel neutrális hatású. Az inzulinfüggő relaxáció ebben a csoportban kevésbé gátolt, mint DHT kezelést követően.

Korábbi megfigyelésekkel megegyezően, az indometacinnal inkubált ereken mindenütt jobb vazorelaxációs képességet észleltünk. Deliepizzi már 1997-ben a ciklooxigenáz gátló indometacinum mellett a vazorelaxáció enyhe fokozódását írták le (Deliepizzi 1997).

Az indometacin a prosztanoid hatások felfüggesztésével a kontroll csoport relaxációját érdemben nem befolyásolta. Ugyanakkor mindkét dihidrotesztoszteron kezelt csoportban nagyobb lett az inzulinfüggő relaxáció. Nagy dózisú inzulin alkalmazásakor

(150-300mNE/ml) a D₃-vitaminos csoportban a kizárólag DHT kezelésben részesültek ereinél volt szignifikánsan nagyobb mérvű a relaxáció, tehát javult. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a relaxáció növekedése konstriktor prosztanoid hatás felfüggesztésének a következménye.

Eredményeink alapján úgy látjuk, hogy a D₃-vitamin kezelés lokális hatása az NO-függő relaxáció mérsékelt javulása, melyet egy konstriktor prosztanoid hatásának erősödése lokálisan neutralizál. Mindezt az inkubátlan érszegmenseken bekövetkező változásokból összevetve arra következtethetünk, hogy további részmechanizmusok is szerepet játszhatnak a vazorelaxációs kapacitás kialakításában. Ez lehet például az EDHF (endothelium derived- hyperpolarizing factor), vagy más egyéb tényezők (Luksha 2009). Leírták azonban, hogy a szénhidrát háztartás, pontosabban az inzulin rezisztencia javulása és a glukóz anyagcsere jó irányú befolyásolása D₃-vitamin adását követően az NO válaszkészség javulását váltotta ki (Ngo 2011, Wehr 2011). Bár tudjuk, hogy az inzulin rezisztencia szisztémás kialakulása hosszabb távon a nagyerek károsodását, ateroszklerózist is vonhat maga után, meg kell állapítanunk, hogy annak rendezése önmagában nem oldotta meg a nagyerek szintjén a hiperandrogén állapot által kiváltott vaszkuláris károsodásokat. Kotsa és munkatársai közölték 2009-ben, hogy obese PCOS-ben szenvedő nőknél D₃-vitamin adagolással az inzulin szekréciót szignifikánsan emelni tudták (Kotsa 2009). Az általunk is alkalmazott dihidrotesztoszteron kezelés, de hosszabb idő alatt (Manneras 90 nap) hipertóniát is okozott – míg a mi 70 napos kezelés során még nem tapasztaltunk szignifikáns vérnyomás különbséget a vizsgálati csoportok között. Ezért a detektált változások a vérnyomástól függetlenül és így vagy közvetlenül a hiperandrogén állapot következményeként alakultak ki, vagy a hiperinzulinémia és inzulin rezisztencia következményeinek tekinthetőek. Fentiek alapján modellünkben korai, kezdeti elváltozásokat, az érkárosodások talán első lépcsőfokát tudtuk tanulmányozni. Nem alakult még ki hipertónia vagy 2TDM a kísérlet időtartama alatt.

Jelen vizsgálataink alapján az aortán a vazorelaxáció károsodása elsősorban hiperandrogén hatásra alakult ki. Ebben a folyamatban egyéb érkárosodási mechanizmus, például a Yanes által is leírt oxidatív stressz növekedése is közreműködhet. Ennek tekinthető az általuk kimutatott emelkedett TGF-alfa, leptin- és koleszterinszint, valamint a NOX-4 (NADPH-oxidáz-4) expresszió fokozódás is (Yanes

2011). Ugyancsak Yanes és munkatársai mutatták ki, hogy intrarenálisan az angiotenzinogén mennyisége és az ACE expresszió hiperandrogén állatokban nagyobb, míg az AngII R1 expresszió csökkent mértékű. Ezek az anyagcsere eltérések alapvetően befolyásolják az erek farmakológiai válaszkészségét.

Figyelembe kell vennünk a krónikus hiperandrogén állapot közvetlen érhatásait is. Adams és munkatársai már 1995-ben leírták ovariektomizált nőstény majmok tesztoszteron kezelésekor a szív koszorúsereinek arterioszklerotikus progresszióját, ugyanakkor androsztendion hatását neutrálisnak találták erre a paraméterre (Adams 1995). A férfi nem és a tartós tesztoszteron kezelés az arterioszklerózis és a szív és érrendszeri betegségek régóta ismert független rizikófaktora. Másrészt Cornoldi vizsgálatai szerint a tesztoszteron fiziológias szintre való visszaállítása csökkenti az iszkémiás események számát és rendezi a HOMA-IR-t hormonhiányos idős férfiakon. Természetesen ez a hormonhatás a fiziológias feletti hormonszintekre nem feltétlenül igaz (Cornoldi 2010). PCOS vonatkozásában szintén ismert a nagyerek rugalmatlanabbá válása, az érfali merevség fokozódása (Sasaki 2011). Soares fiatal, ismert rizikófaktoroktól mentes PCOS-es nőknél mutatta ki az artéria carotis communis „stiffnes” fokozódását (Soares 2009). PCOS-ben az átlag populációhoz viszonyítva lényegesen gyakrabban fordul elő a metabolikus szindróma minden összetevője, beleértve az inzulin rezisztenciát is (Dokras 2008). Eddig azonban hiányos ismeretekkel rendelkezünk ennek a folyamatnak az első lépéseiről, a korai érkárosodások mechanizmusáról. Cussons eredményei alapján is látható, hogy PCOS-ban korán, és fokozatosan alakulnak ki érkárosodások. E szerző még normális stiffness mellett mutatott ki csökkenést az alkar artériáiban az áramlás indukálta vazodilatációban (Cussons 2009).

A direkt androgén érhatás akutan inkább vazorelaxációt eredményez. Mind a tesztoszteron, mind a dihidrotesztoszteron az L-típusú feszültségfüggő Ca-csatornákat gátolja (DHT dózistól függően), míg tesztoszteron nagy (mikromólos) koncentrációkban Ca-antagonista hatás mellett cAMP növekedés révén is okoz direkt vazorelaxációt patkány aortán (Montano 2008). Hasonló, az ösztradiolnál valamivel gyengébb Ca-függő vazorelaxációs hatást mutattak ki patkány aortán fenilefrin prekontrakciót követően is (Castillo 2006).

Vizsgálataink során felmerült, hogy a dihidrotesztoszteron kezelést követően alkalmazott indometacin konstriktor prosztanoid hatást oldott föl. Gonzalez agyi ereken krónikus tesztoszteron kezelést követően TXA₂ közvetítésével endoteliális TP-receptoron megvalósuló fokozott bazális értónust talált, melyhez hasonló mechanizmus az általunk leírt jelenséget is magyarázhatja (Gonzalez 2005). A krónikus androgén kezelés érhatásai jelenleg is vitatottak – részben fajspecifikusak, részben pedig a különböző androgén vegyületek eltérő hatásai is feltételezhetők (Adams 1995).

7.2. D-vitamin

Ismert, hogy a D-vitamin akut alkalmazása csökkenti a prosztanoid függő vazokonstriktiót mind SHR mind WKY patkány törzsekben is (Wong 2010). A szerzők felvetették ezért a D-vitamin hiány szerepét a hipertonia patomechanizmusában, mivel a D-vitamin akut adagolásban is csökkenti az endoteliális diszfunkciót az endotélfüggő 6-keto-PGF₁alfa vazokonstriktió mérséklésével SHR patkányokban (Wong 2010).

Többen felvetették, hogy a D-vitamin hiánynak szerepe lehet a PCOS-ban tapasztalt inzulin rezisztenciában, pótlása a cukoranyagcserére is pozitív hatású (Ngo 2011). A D-vitamin pótlás manifeszt elváltozások esetén is előnyös; diabetes mellitusban D-vitamin adása fokozta az alkari artériás véráramlás kiváltotta vazodilatációt (Yiu 2011). Pittas és munkatársai írták le, hogy nőkben a napi 800 NE D-vitamin fogyasztás 1/3-ra csökkentette a II típusú diabetes mellitus kialakulásának a rizikóját (napi 400 NE D-vitamin fogyasztásával összehasonlítva, Pittas 2006). Hypponen és mtsai vizsgálatából arra derült fény, hogy a kora gyermekkorban adagolt napi 2000 NE D-vitamin szubsztitúció hosszú távon csökkenti az I típusú diabetes mellitus kialakulását, 31 éves utánkövetés során vizsgálva. Öt vizsgálat metaanalíziséből igazolást nyert, hogy a megfelelő D-vitamin szubsztitúció csökkenti az I-es típusú diabetes előfordulását (2008 Zipitis). Wehr és munkatársai 206 PCOS-ben szenvedő nőben igazolták, hogy a D-hipovitaminózis szoros összefüggést mutat a kedvezőtlen metabolikus eltérésekkel (Wehr 2009).

Kísérletes körülmények között igazolták, hogy SHR patkányokban 6 hetes D-vitamin kezelés normalizálta, növelte az ACh-relaxációt – de ez nem függött össze az intracelluláris Ca-egyensúllyal, ami a kezelés mellett változatlan maradt. Ez a ROS

(reaktív oxidatív szabadgyökök) és a COX-1 expresszió csökkenésével korrelált (Wong 2010). Ugyanez a kutatócsoport már két évvel korábban vizsgálta a D-vitamin derivátumainak akut hatását a patkány aorta endotélfüggő válaszreakcióiban és azt találta, hogy a D₃-vitamin akutan az SHR patkányok aortagyűrűiben a kontrakciók nagyságát csökkentette, mégpedig a calcium (Ca²⁺) ion beáramlás befolyásolásával, amellyel az endoteliális vazokonstriktorok elválasztását mérsékelte (Wong 2008).

Fentiek ismeretében a hiperandrogén közegben érvényesülő D-vitamin hatás értelmezésekor számolnunk kell a D-vitamin direkt érhatásaival is. Emellett a DHT interakciót és az inzulinrezisztencia javulásakor jelentkező közvetett érhatásokat is figyelembe kell vennünk, bár ez utóbbi az inzulinfüggő relaxációnál nem volt domináns.

7.3. Vazoreaktivitás

Kísérleteinkben elsőként tanulmányoztuk a PCOS modellben kialakuló korai eltéréseket és ezek változásait D₃-vitamin kezelést követően patkány aortán.

7.3.1 Noradrenalin kiváltott kontrakciók

A fokozatosan emelkedő dózisban alkalmazott NA-nal kontrakciónövekedést idéztünk elő mindhárom csoportban. A dihidrotszteronnal kezelt állatokból származó aortagyűrűk kontrakciója szignifikánsan erőteljesebb volt, mint a kontroll csoportéból származóké ($p < 0,05$). D-vitamin kezelés hatására a kontrakció nem különbözött szignifikánsan a tesztoszteronnal kezelt csoportétól, bár a kontrakció mértéke csökkent. Eredményeinkből kiemelendő, hogy DHT kezelés hatására a hiperandrogén állapotban a noradrenalin kontrakció megnőtt, ezt a hatást az egyidejű D₃-vitamin kezelés mérsékelte (10. ábra).

A különbségek mögött álló mechanizmusokat blokkolószer alkalmazásával tanulmányoztuk. Ennek során az L-NAME hatására a DHT kezelt csoport ereiben jelentős tónusfokozódást mutattunk ki ($p < 0,0001$). Ezt a D₃-vitamin kezelés csökkentette, de nem vitte vissza a kontroll szintjére, a kontrakciók mértéke kisebb volt, mint a DHT-s csoportban és nagyobb, mint a kontrollokéban. A D-vitaminos görbe

szignifikánsan különbözik mindkét másik válaszgörbétől (11. ábra). Ezen az ábrán az egyes csoportokon belüli NO-blokkolásból adódó konstriktó változások láthatóak, a bazális értónuson belüli NO-tónus gátlása adódik hozzá egy közel maximális NA-kontrakcióhoz. A konstriktor hatásokkal szemben kevésbé érzékeny kontrollok NO-tónusa csak a maximális NA-kontrakció alkalmazásakor közelítette meg a két DHT kezelt csoportét. Tehát a kontrollok esetében a paralell NO relaxáció effektívebb volt mint a DHT-s csoportban. Ezekből az adatokból úgy tűnik, hogy ha az ereket lokális stimulus éri, az adekvát reakció mellett azonnal a nyugalmi tónus irányába ható kompenzációs mechanizmus aktiválódik. Ez a mechanizmus a kontrollok esetében jóval effektívebb. DHT+D₃ kezelés során az erek rendelkeznek relaxációs tartalékokkal, de ez már közepes vazokonstriktor stimulussal kimeríthetőnek tűnik. A kontrakció fokozódásához a kontraktilis proteinek exoresszójának fokozódása vagy a simaizom sejtek fekszínén lévő alfa adrenerg receptorok expressziójának fokozódása is hozzá járulhatott (Philippe 1991, Osterlund 2010).

Indometacin esetében a DHT kezeltékben ismét fokozott tónust találtunk a kontrollhoz képest. Ugyanakkor a D₃-vitamin kezelt erekben bifázisos választ mértünk: kis vazokonstriktor stimulusra a kontrollhoz hasonló, a DHT kezeltéknél szignifikánsan kisebb kontrakciót észleltünk, míg nagyobb konstriktor stimulus esetén a DHT kezeltékéhez hasonló, a kontrollhoz képest nagyobb konstriktó volt kimutatható. Ez a vizsgálat is az előzőhöz hasonlóan azt mutatta, hogy a D-vitamin kezelés fokozza a spontán értónus relaxációs tartalékait.

7.3.2. Ach Relaxáció

Az ACh relaxáció nagyobb a kontrollban, mint a két DHT kezelt csoportban, azonban a D-vitaminos erek a nagyobb dózisok mellett szintén jobban relaxáltak mint a dihidrotesztoszteronnal kezelték ($p < 0,05$ DHT+D₃ vs. DHT).

L-NAME hatására a DHT-s erekben is volt NO-tónus, de kontraháltabbak maradtak, mint a kontroll erek; a D-vitamin kezelés a kontroll szintjére vitte vissza a relaxációt.

Az indometacin előkezelés eltünteti a tónus különbséget az egyes csoport között, ezért feltételezhető, hogy az alaptónusban és az ACh-függő relaxációban látható különbségek prosztanoid-függő érhatásokból adódnak, tehát konstriktor/relaxációs prosztanoidok okozta különbségekből.

Megállapítható tehát, hogy az ACh-relaxáció során a D-vitamin kezelt csoport ereiben az NO-termelés fokozódását a konstriktor prosztanoidok hatása ellensúlyozza. Utóbbi csak nagy koncentrációjú ACh alkalmazásakor semlegesíti az NO-felszabadulás fokozódása, így csak a két legnagyobb dózis alkalmazásakor mértünk nagyobb mértékű relaxációt a D-vitamin kezelt csoportban a kizárólag DHT kezelt csoport ereihez képest. Az általunk is alkalmazott kezelés a miénknél hosszabb idő alatt (90 nap) az eredeti modellben (Manneras 2007, Yanes 2011) hypertóniát is okozott – míg mi, 70 napos kezelést követően vérnyomás különbséget nem tapasztaltunk a vizsgálati csoportok között. Ugyanakkor a már normotenzív állapotban jelentkező kontraktilitás fokozódás és csökkent acetilkolin és ösztradiol függő relaxációs készség már prehipertenzív elváltozásoknak tekinthetőek. A relaxációs tartalékok kimutatott csökkenése, a kialakuló hipertónia öngerjesztő körének lokális faktora lehet. Keller és munkatársai szintén megnövekedett kontraktilitási képességet és csökkent ACh-függő relaxációs kapacitást tudtak kimutatni még normotenzív állapotban, de már a kialakulóban lévő hipertónia bevezető kórelletani elváltozásaként (Keller 2011). A D-vitamin kezeltékben tapasztalható részleges kompenzációs mehanizmusok lokális hatásként a hipertónia kialakulása ellen hatnak. Ugyanakkor tartós presszor hatásra a D-vitamin kezelés antihipertenzív effektusa gyengül. Mivel modellünkben az állatok vérnyomása nem különbözött, ezért a detektált érbiomechanikai változások vagy közvetlenül a hiperandrogén állapot következményei, vagy pedig a kialakult inzulin rezisztencia

következményeinek tekinthető, amint ezt korábbi vizsgálatunkban tapasztaltuk (Sára 2012).

PCOS-es nőkben a nagyerek mechanikai károsodásán (Lakhani 2000, Dokras 2008) kívül jelentős farmakológiai reaktivitás változások alakulnak ki. Fenti szerzők PCOS-ben illetve hiperandrogén körülmények között vizsgálták a simaizomfüggő- és endotélfüggő relaxáció és a vazokonstriktió változásait is.

Kravariti mind az endotélfüggő (FMD), mind a simaizomfüggő (nitrát-mediálta) vazorelaxációban jelentős csökkenést mért PCOS-ben az egészséges kontrollokhoz képest (Kravariti 2005). A csökkent áramlás független meghatározói voltak az inzulin rezisztencia, a hiperandrogén állapot mértéke és a koleszterinszint. Megállapította, hogy a húszas évektől, az obezitástól függetlenül kimutatható az endotélkárosodás PCOS-es nőkben, és ennek szoros követését javasolta a célszervi szövődmények kivédésére (Kravariti 2005).

Az áramlás indukálta vazodilatációt számos munkacsoport tanulmányozta, melyek a vizsgált populáció és a vizsgálómódszer függvényében vagy hasonló eredményre jutottak, vagy nem találtak különbséget a PCOS-es és az egészséges populáció között (Soyman 2011, Arian 2009).

A látszólagos ellentmondásra Cussons vizsgálatai adják meg a választ, aki szerint lépcsőzetesen alakulnak ki az egyes érkárosodások. Legkorábban észlelhető eltérésként az áramlás indukálta vazodilatáció csökkenését találta PCOS-ben, még élettanilag tekinthető artériás merevség mellett (Cussons, 2009). Összességében megállapítható, hogy a fokozatosan, feltehetően a húszas-harmincas évekkben kialakuló korai, iniciális elváltozások képezik a későbbi hipertónia és metabolikus szindróma alapját (Dokras 2008).

A vazoreaktivitást vizsgálva Malkin tesztoszteron hatására akutan vazodilatációt, krónikus adagolást követően pedig endotélfüggő és -független relaxáció csökkenést, valamint noradrenalinra bekövetkező növekedett kontrakciót írt le (Malkin 2006). Tesztoszteron előkezelést követően kasztrált patkányokban az alaptónus tromboxánfüggő fokozódását is tapasztalták. TXA₂ akut alkalmazásakor ugyan nem alakult ki nagyobb vazokonstriktió, de a tromboxán szintézis és receptor gátlás vazodilatációs hatása az androgénnel kezelt patkányok agyi erein nagyobb volt (Gonzales 2005). Hasonló mechanizmus magyarázhatja a konstriktor prosztanoidok általunk is detektált

hatásfokozódását a hiperandrogén nőstény patkányainkban. Korábban ugyancsak Gonzales mutatta ki patkány agyi ereken a tesztoszteron hatására csökkent endotélfüggő vazodilatációt, mely sem COX, sem NO függést nem mutatott (Gonzales 2004). E szerző beszámolt arról is, hogy tesztoszteron kezelés hatására a tromboxán által kiváltott kontraktilitás növekedését lehetett tapasztalni patkány agyi artériákon (Gonzales 2005). Az egyes, PCOS kezelésében használt készítmények hatásai az erek farmakológiai válaszkészségére jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezik. Meyer szerint is a PCOS terápiája során a hiperandrogén tünetek mellett érdemes figyelembe venni a cukoranyagcsere és az érfalmerevség, és a pulzus hullám terjedési sebesség változásait is. Ennek alapján javasolta inkább a metformin kezelés alkalmazását a magas hormontartalmú fogamzásgátlók helyett (Meyer 2007). Agarwal vizsgálatai szerint a metformin csökkenti az érfal merevséget (arterial stiffness), az aorta és az alkari artéria pulzus hullám terjedési sebességét, javítja az augmentációs indexet, az endotélium függő és független érválaszokat, vagyis javítja az endotél funkciókat (Agarwal 2010). Inzulinszenzitiváló kezelés során mind metformin, mind pioglitazone hatására az áramlás indukálta vazodilatáció növekedését írták le PCOS-ben szenvedő nőkben (Naka 2011).

A PCOS-ban alkalmazott kezelések gyakran módosítják e betegség a szív és érrendszeri kockázatát is (Meyer 2007, Agarwal 2010). Magas hormontartalmú fogamzásgátló szerek esetleg növelhetik, metformin pedig igazoltan javítja a szív és érrendszeri kockázatot, míg kis dózisú fogamzásgátló valószínűleg érdemben nem befolyásolja ezt (Meyer 2007, Agarwal 2010). Jelen vizsgálatunkig nem volt azonban adat arra vonatkozóan, hogy a D₃-vitamin kezelés hogyan változtatja meg a nagyerek vaszkuláris adaptációját, farmakológiai válaszkészségét vazokonstriktor és vazodilatátor stimulusokra. Pedig a D₃-vitamin adjuváns kezelésként alkalmazható policisztás ovárium szindrómában (Thys-Jacobs 1999), és kardiovaszkuláris védő hatása is ismert (Przybylski 2010, Wong 2010, Yiu 2011).

Vizsgálatainkban elsőként teszteltük PCOS modellben a D-vitamin kezelés hatásait vazokonstriktorra és endotél függő vazodilatációra patkány aortán. Vizsgálataink előtt is ismert volt, hogy a D-vitamin közvetlen hatásként krónikus adagolásban SHR patkányokban csökkenti a vérnyomást és izolált ereken a vazokonstriktor választ. Ez utóbbi hatás a COX-1 expresszió csökkenése révén valósult meg, míg az intracelluláris

Ca⁺⁺-szintek változatlanok maradtak (Wong 2010). Az érfal párhuzamos strukturális és funkcionális változását mutatta ki Yiu és munkacsoportja. 2TDM-ban (2-típusú diabetes mellitusban) D-vitamin hiány endoteliális diszfunkciót, azaz az áramlás indukálta csökkenését okozta az alkari artérián mérve, a keringő endoteliális progenitor sejtek számának csökkenésével (Yiu 2011). Az endoteliális diszfunkciót javíthatja a D-vitamin hatására növekvő VEGF expresszió is (Cardus 2009). Modellünkben a D-vitamin krónikus adagolása összetett változásokat eredményezett. A DHT kezelés által fokozott kontrakció és csökkentett dilatáció mérsékelt kompenzációja mellett az acetilkolin függő relaxáció kismérvű, de szignifikáns csökkentését detektáltuk. Ennek mechanizmusa további vizsgálatot igényel, de az acetilkolinnal végzett vizsgálatainkból a nitrogén monoxid / prosztanoid rendszerek egyensúlyának változására következtethetünk.

7.4. Ösztrogén

Kutatásunk során elsőként vizsgáltuk meg az E₂ nagyérre, aortára gyakorolt relaxáló képességét, valamint a D₃-vitamin módosító hatását hiperandrogén környezetben, a PCOS tesztoszteronnal indukált rágcsáló modelljében.

Az E₂ relaxáló hatását megelőző referencia kontrakciók

A K⁺-mal létrehozott referencia kontrakciók az érszégmensek működőképességét igazolták, nagyságuk a három csoportban nem különbözött. NA-nal létrehozott érösszehúzó hatásokban az előzőekhez hasonlóan láthatóvá vált, hogy a dihidrotesztoszteronnal kezelt állatokból származó aortagyűrűk kontrakciós képessége szignifikánsan megnőtt, amelyet a D-vitamin kezelés némileg mérsékelt.

7.4.1. Az ösztradiol relaxáló hatása

A DHT-val kezelt állatokból származó aortagyűrűk relaxáló képessége jelentősen csökkent a kontrollokéhoz hasonlítva (p<0,001), és a D₃-vitamin kezelésnek erre nem volt erre szignifikáns hatása (16. ábra). Ez magyarázhatja, hogy hiperandrogén közegben az ösztradiol kardiovaszkuláris protektív hatása miért nem érvényesül. Az

ösztadiol a fiziológiásnál nagyobb koncentrációkban markáns vazorelaxációs hatású. A dihidrotesztoszteron mérsékeltebben, de szintén akut vazorelaxáns. Ugyanakkor krónikusan hiperandrogén közegben, az ösztadiol vazorelaxáns hatása, de jelentős mértékben csökken. Úgy tűnik D-vitamin kezelésnek ebben a vonatkozásban inkább az E₂-függő vazorelaxációt enyhén gyengítő hatása van. Aorta falvastagság és egyéb morfológiai eltérés méréseink során nem volt még tapasztalható. Vizsgálatainkban tehát a legkorábbi, még a morfológiai vizsgálómódszerekkel mérhető strukturális változások előtti érreaktivitásbeli eltéréseket detektálhattuk.

Kevés adatunk van az ösztrogén érhatásairól hiperandrogén közegben. New eredményei szerint hiperandrogenitás esetén az ösztrogén pozitív kardiovaszkuláris hatásai nem érvényesülnek. A kontroll férfi csoporthoz képest nem volt különbség az ösztadiollal kezelt transzsexuálisok arteriás compliance-ában, vérnyomás értékeiben, koleszterinszintjeikben, és az összesített kardiovaszkuláris rizikójukban. Eredményeink New vizsgálataival korrelálnak. Feltételezhető, hogy az ismertetett gyengébb relaxáns hatás, mely androgének jelenlétének kimutatható, már összevethető mértékű a hiperandrogén közegben kialakuló csökkent ösztadiol relaxációval, ezért nem volt különbség a vérnyomásban és a compliance-ban (New 2000). A PCOS-ben szenvedő nők kórélettani eltérései mind a nagyerek mechanikus károsodásában, mind pedig a farmakológiai reaktivitás változásaiban is megnyilvánulnak (Dokras 2008, Lakhani 2000). Dokras rámutat, hogy a PCOS-es nőkben már a 40-es éveik elején szív és érrendszeri eltérések alakulhatnak ki, dacára a normális ösztrogén szinteknek (Dokras 2008). Talán ez lehet a következménye az E₂ általunk is mért csökkent vazorelaxáns kapacitásának hiperandrogén környezetben. Ugyanúgy, ez a hiperandrogén környezetben tapasztalt gyengült vazorelaxációs képesség talán részben magyarázatot adhat arra is, hogy a jól ismert kardiovaszkuláris védő hatásokkal bíró ösztadiol, vajon miért vallott kudarcot a klinikai vizsgálatokban a 60 év feletti nőkben jóval a menopauza kezdete után használva? A menopauzális hormon terápia alkalmazásával sem primér, sem szekunder prevencióban nem sikerült jótékony hatást igazolni a szív és érrendszeri megbetegedések kivédésében (Women's Health Initiative WHI), avagy az események megelőzésében a szekunder prevencióban (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study, HERS I-II) (Anderson 2004, Grady 2002), csak két igen fontos vizsgálatot említve a sok szintén hasonló eredményt felmutató vizsgálat sorozat közül.

Mindegyik esetben kedvező hatást csak 60 év alatt sikerült igazolni. Mint tudjuk az ováriumok ösztrogén elválasztása fokozatosan áll le, és így a kismértékű, de folyamatos androgén termelés 60 év felett már hatásaiban felülmúlhatja az E₂-ét.

Az ösztrogénnek számos fiziológiás hatása ismert: többek között az értónus szabályozásában is szerepe van. A vazodilatatív érhatások endotélium függő és független módokon hathatnak, genomikus, vagy nem genomikus utakon keresztül is (Mendelsshon 1999, Orshal 2004). Az akut vazomotoros válaszok nagyjából nem genomikus úton hatnak és főleg az endotélium épségén múlnak. Az E₂ a plazma membrán ösztrogén receptorait stimulálva az endoteliális NO szintáz (e-NOS) működését aktiválja és ez az NO szintézis növekedését idézi elő ami simaizom relaxációt okoz többnyire a cGMP (ciklusos guanozin mono foszfát) segítségével. Az ösztrogén receptorok az érfal minden rétegében megtalálhatóak, az endotéliumban, a simaizomsejteken és az adventitiában is (Miller 2010). Az E₂ vazodilatatív képessége jól dokumentált in vivo és in vitro egyaránt. Andersen már 1999-ben hosszú távú és rövid hatású ösztrogén választ különített el patkány aortán. A hosszútávú hatás endotéliumon keresztül nagyrészt NO felszabadulás mellett ment végbe, de az akut hatásban a simaizomsejteknek is volt szerepük amint ezt Kakucs és munkatársai is már korábban kimutatták patkány saphena artérián (Kakucs 1998). A különböző kontraktilis anyagokkal kiváltott összehúzódások mértéke csökkent a hosszú távú hatás és az akutan adott E₂ hatás mellett is de különböző mértékben (Andersen 1999).

7.4.2. A tesztoszteron hatása

A tesztoszteron akut hatása enyhébb mértékben szintén vazodilatáció, a hatásmechanizmus az érfali simaizom L-típusú feszültségfüggő Ca⁺⁺ csatornák inaktiválásán keresztül, esetleg a Ca⁺⁺ és K⁺ csatornák nyitása aktiválása révén valósul meg (Perusquia 2010). Torres és munkatársai vizsgálták a szex hormonok moduláló hatását az aorta vaszkuláris reaktivitására hím metabolikus szindrómában szenvedő patkányokban. Azt találták, hogy a tesztoszteron endotél diszfunkciót okozott és ennek a korrigálását vagy a kasztrációval, vagy a kasztrált állatok E₂-lal való ellátásával lehetett elérni (Torres 2007).

Az E₂ hatásról hiperandrogén környezetben kevés adat áll rendelkezésünkre, PCOS vonatkozásában pedig ilyen adat nincs is. Kísérletünkben hiperandrogén környezetben bár működött, de jelentősen csökkent az E₂ vazorelaxáns kapacitása. New megfigyelései is erre utalnak, miszerint az ösztrogén előnyös kardiovaszkuláris hatásai hiperandrogén környezetben nem manifesztálódnak (New 2000). Hímnemből nőnemre váltó transzsexuális ösztrogénnel kezelt egyedekben a kontroll férfiak csoportjával összehasonlítva nem talált különbséget sem a vérnyomásban, sem a koleszterin szintekben vagy más egyéb kardiovaszkuláris rizikófaktorok megjelenésében. A mi eredményeink is New és Li megfigyeléseihez hasonlíthatók. Li azt találta, hogy a ciklooxygenáz-2 és thromboxán upregulációja folyamán az ösztrogén konstriktor prosztanoid funkciókat szabadít fel nőstény patány aortában, mind az endotéliumban mind pedig a simaizomsejtekben, a tromboxán receptorok expressziójának növelésével akár a hím, akár ovariektomizált nőstény patkányokkal összehasonlítva (Li 2008). Az E₂ csökkent relaxációs kapacitása az általunk kialakított hiperandrogén környezetben végzett vizsgálatunkban is lehet a konstriktor prosztanoidok dominanciájának az eredménye, de ennek bizonyítására további megfigyelésekre lesz szükségünk. A kísérlet elvégzésekor az aortafal vastagodása, vagy egyéb morfológiai eltérés még nem alakult ki. Így a vizsgálatainkban a legkorábbi morfológiai, illetve biomechanikai metodikával már vizsgálható vazoaktivitásbeli változásokat tudtuk nyomon követni még a jelentősebb strukturális károsodások kialakulása előtt. E megfigyelésünk, megítélésünk szerint kellő relevanciájú a policisztás ovárium szindróma klinikai állapotában is, amelyről tudjuk, hogy a nők kardiovaszkuláris rizikóját az egész életen keresztül fokozza. A posztmenopauzális hipertónia megértésében is segíthet, és talán részben megmagyarázza a kardiovaszkuláris események megelőzésére nem kellő időben alkalmazott ösztradiol terápia kudarcát is.

7.5. PARP aktivitás

A PARP aktivitás megbeszélése a PAR festődés eredményei alapján.

Az immunhisztokémiai elemzés a különböző szövetekben a különböző vizsgálati csoportjainkban (petefészekben és leukocitákban) a DHT kezelt állatokban a PAR

festődés növekedését, a D₃-vitamin kezelés hatására pedig a PAR festődés szignifikáns csökkenését mutatta (18. A és B ábra). Az aortában az endotéliumsejtekben és a simaizomsejtekben azonban, meglepetésre a PARP aktivitás szignifikáns mértékben csökkent a DHT kezelés hatására és a D₃-vitaminnak erre nem volt semmiféle befolyása (18. C és D ábra). Mostani eredményeinkkel analóg módon hasonló, regionális különbség volt megfigyelhető az inzulin által kiváltott PARP aktivitásbeli változásokban is. Az inzulin ugyanis csökkentette a PARP aktivitást a leukocitákban, de nem befolyásolta azt a placentában, vagy az umbilikális artériában (Horváth EM 2009). Ez a regionális különbséget esetleg a dihidrotesztoszteron kompenzáló védő hatása okozza, mint ahogy ezt Xu és munkatársai HUVEC tenyészetben kimutatták (Xu 2010). Ők ugyanis DHT előkezelést követően az oxidatív stressz enzimek, közöttük a caspase-3 és -9 mennyiségének csökkenését tudták kimutatni endoteliális sejtekben (Xu 2010). A diabéteszes kardiomiopátiák különböző rágcsáló modelljeiben szívizomsejtekben és endoteliális sejtekben a fehérje nitrációnak és a poly (ADP) ribozilációnak szignifikáns mértékű növekedését igazolták, és ezeknek a mértékét PARP gátlókkal lényegesen csökkenteni tudták (Soriano 2001, Szabo 2005). Számos bizonyíték áll már rendelkezésre néhány olyan endogén és exogén anyagról, amelyeknek befolyásoló hatása van a PARP aktivitásra. Itt kell megemlítenünk, hogy Virág és Mabley munkássága nyomán PARP gátlónak ismertük meg az E₂-t, valamint a D-vitamin aktív formáját is (Virág 2002, Mabley 2007). Mabley és munkatársai 2005-ben, az endotoxin által kiváltott gyulladáshoz és vaszkuláris válaszokhoz nemmi különbségeket fedeztek fel a PARP aktivitásban. Úgy találták, hogy a PARP gátlás csökkentette a hím egerek gyulladáshoz való reakcióit és a halálozásukat is, de ugyanez nem volt hatással a nőstény állatokra (Mabley 2005). Egy fázis II-es prospektív, egyes-vak, multicentrikus dóziskereső vizsgálatban az (INO-1001) PARP inhibitor különböző dózisait alkalmazták egyszeri dózisban ST elevációs miokardiális infarktuszban szenvedő betegen. Ez csökkentette a CRP szintjét és gyulladást jelölő interleukin (IL-6) szintjét is (Morrow 2009).

Bár igen sok klinikai szituációban tanulmányozták már a PARP aktivitást, PCOS-ben ezideig nem, mi a PCOS patkány modellünkben ezt a hiányt pótoltuk. Policisztás ovárium szindrómában a szív és érrendszeri rizikó a kedvezőtlen hormonális, metabolikus prediabetikus és gyulladáshoz vezető eltérések miatt kifejezetten megnő. Érdekes,

hogy ezek az eltérések nem csak a fiatal korban a tünetek megjelenésekor, de jóval később a változás korában is fennállnak (Puurunen 2011). A mi PARP-os eredményeink összhangban vannak az eddig hipertóniában és diabéteszben végzett kutatások eredményeivel (Virág 2002, Erdélyi 2005, Pacher és Szabó 2007, 2008) amennyiben a DHT kezelés szignifikánsan fokozta az ováriumokban és a fehérvérsejtekben a poly (ADP)ribozilációt, vagyis a PARP aktivitást és ez összefügg azzal a ténnyel, hogy a PCOS klinikai állapotban megnő a hipertónia és a diabétesz mellitusz kialakulásának a rizikója. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy a PARP milyen szerepet játszik a hipertónia, a diabétesz mellitusz és kardiovaszkuláris károsodások kialakításában PCOS-ben, vizsgálatunkkal az első lépést ez irányban már meg is tettük. Eredményeink szerint a PARP enzim patológiás aktiválódása az egyik összekötő kapocs lehet a policisztás ovárium szindróma szív és érrendszeri károsodásainak kialakulásában. Ezen túlmenően a D-vitamin egyik terápiás hatása lehet, hogy PARP gátlóként helyrehozhatja ezeket az eltéréseket.

8. Következtetések, saját kutatási eredmények összefoglalása

Inzulin

Vizsgálatunkban először mutattuk ki a hiperandrogén környezetben bekövetkező csökkent inzulinfüggő vazorelaxációs képességet aortán, amellyel kapcsolatban a D-vitamin védő hatását nem tudtuk igazolni, ugyanis az általunk tapasztalt vaszkuláris inzulin rezisztenciát a D-vitamin nem korrigálta. Az androgén hatásra jelentkező relaxáció csökkenés, csakúgy, mint maga az inzulin által létrehozott relaxáció, részben NO-függőnek bizonyult. A D₃-vitamin összességében neutrális hatású volt aortán. Eredményeink arra utalnak, hogy lokális konstriktor prosztanoid hatások a D₃-vitamin kezelésre létrejött NO-függő relaxáció mérsékelt javulását ellensúlyozzák. Ebben a folyamatban egyéb NO-független relaxációs hatásnak is szerepe lehet a részletes hatásmechanizmus további vizsgálata szükséges.

Vazoreaktivitási eltérések

Vizsgálatainkkal elsőként mutattuk ki, hogy a PCOS modellben patkány aortán mért noradrenalin kontrakció fokozódik és ezt, az egyidejűleg alkalmazott D₃-vitamin kezelés mérsékli. Klinikai értelemben a D₃-vitaminnak a prehipertenzív elváltozások feltartóztatásában szerepe lehet. Kimutattuk, hogy PCOS-ben az endotéliális ACh-függő NO-mediálta vazorelaxáció károsodott, és ezt a D₃-vitamin részlegesen kompenzálta. A teljes kompenzációt valószínűleg a vazokonstriktor prosztanoidok hatása akadályozta. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a hiperandrogén státusz prehipertenzív állapotot okoz, és a vazorelaxációs kapacitás beszűküléshez vezethet. Ennek a PCOS klinikai megjelenésében is szerepe lehet, ami a kardiovaszkuláris rizikó csökkentésére alkalmazott intervenciók korai bevetésére kell, hogy sarkalljon bennüket. A D₃-vitamin kezeléssel a hiperandrogén környezet következtében létrejött vazokonstriktor aktivitás emelkedett szintjét regenerálni tudtuk. Vizsgálatunkból levonható fontos következtetés, hogy a PCOS-ben adjuváns kezelésként alkalmazott D-vitamin a nagyerek szintjén is gátolhatja a prehipertenzív károsodások kialakulását.

Ösztrogén

A DHT kezelés megváltoztatta az aortagyűrűk ösztradiolra adott relaxáló képességét. Az E₂ hiperandrogén környezetben kevésbé volt hatékony, és ezen a D-vitamin hatása sem változtatott jelentős mértékben. Megítélésünk szerint, ezen eredményünk a PCOS-ben tapasztalható szív és érrendszeri elváltozások egyik legfontosabb patomechanizmusára világít rá.

PARP

A DHT előkezeléssel kiváltott policisztás ovárium szindróma károsító hatásai részben a PARP aktivitás fokozódásában nyilvánultak meg (petefészkek és fehérvérsejtek), és ezt a kedvezőtlen állapotot ezekben a szövetekben a D₃-vitamin kezelés teljességgel kivédte. Ezzel szemben a DHT kezelés mellett az aorta falában az endotéliumban és a simaizomsejtekben a PARP aktivitás csökkent és ezen a D₃-vitamin már nem változtatott. Ennek legvalószínűbb oka, hogy modellünk esetében a morfológiai elváltozásokhoz vezető PARP aktivitás fokozódás az aortában még nem jelent meg. Konklúzióként megállapíthatjuk, hogy PCOS szindróma hiteles patkány modelljében, a nagyerek vaszkuláris reakciói összességükben kedvezőtlen irányba változnak, már a legkorábbi funkcionális változások idejében is, és ezekre a változásokra a D-vitamin kezelésnek részleges javító hatása lehet.

9. Összefoglalás

A PCOS egész életre szóló rejtőzködő rendszerbetegség, amely a kardiovaszkuláris rizikót is növeli. Vizsgálatainkat e rizikó egyes elemeinek tanulmányozására összpontosítottuk a PCOS egy patkány modelljében. Kísérleteinkben dihidrotesztoszteron (DHT)-indukálta patkány PCOS modellben vizsgáltuk a nagyerek érreaktivitását és egyes szövetekben a PARP enzim aktivitásának változásait és az 1,25 (OH)₂ D₃ vitamin (calcitriol) ezekre kifejtett hatását.

A PCOS modellt DHT adagoló minipumpákkal hoztuk létre húsz nőstény Wistar patkányban. Ezekből tíz egyidejűleg calcitriol kezelésben is részesült (1,2 µg/tskg/hét). További tíz, álkezelt állat szolgált kontrollként. Tíz hét múlva, myográf segítségével vizsgáltuk az érreaktivitást izolált mellkasi aorta gyűrűkön noradrenalinra (NA), acetilkolinra (ACh), inzulinra és ösztadiolra. Ezt követően a gyűrűket NO-szintáz, illetve cikloxigenáz (COX) gátlókkal inkubáltuk és megismételtük a NA, ACh/ inzulin hatások vizsgálatát. A petefészkek, leukociták és aorta gyűrűk PARP aktivitását immunhisztokémiával értékeltük. A noradrenalinral létrehozott vazokonstriktiót a DHT előkezelés fokozta, melyet a calcitriol kezelés mérsékelte. A relaxációt a DHT kezelés az összes tesztelt relaxáns vonatkozásában mérsékelte. A vazorelaxáció gyengülését a calcitriol kezelés kizárólag az ACh vonatkozásában ellensúlyozta, de csak részben. A NO és COX gátlókkal végzett vizsgálatok megvilágították a calcitriol kis artériákon végzett korábbi vizsgálatainkhoz képest mérsékeltebb protektív hatásának okait. A PARP aktivitás nem változott calcitriol kezelést követően aortán, ugyanakkor közelített a kontroll csoporthoz a petefészkekben és leukocitákon, hasonlóan a funkcionális vizsgálatok eredményeihez. Eredményeink alapján megállapítható, hogy hiperandrogén PCOS modellünkben létrejött fokozott vazokonstriktió és csökkent relaxáció calcitriol kezeléssel részben ellensúlyozható volt. A PARP aktivitás követte az érfunkciós változásokat, mely jelzi a két változás közötti oki kapcsolat lehetőségét.

10. Summary

Polycystic ovary syndrome is a hidden lifelong systemic disease with elevated cardiovascular risk. The purpose of our research was to analyse some of its' factors in a rat model of PCOS. In this study we examined the effects of the hyperandrogenic state in dihydrotestosterone (DHT)-induced polycystic ovary syndrome (PCOS), the vascular responses to different vasoactive agents, PARP activity of different tissues and the modulatory role of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ (calcitriol). A PCOS model was induced by DHT application in twenty female Wistar rats by DHT pellets. Ten of the DHT treated rats simultaneously received calcitriol treatment (1,2 µg/bwkg/wk). After ten weeks, myographs were used to test the reactivity of isolated thoracic aortic rings to norepinephrine, acetylcholine, insulin or estrogen. Thereafter, the vascular rings were incubated with an NO-synthase blocker or a cyclooxygenase inhibitor, and the effects of norepinephrine, and acetylcholine/ insulin were re-evaluated. PARP activity of ovaries, leucocytes and aorta rings were also evaluated by immunohistochemistry. Norepinephrine-induced vasoconstriction was enhanced after DHT treatment, but this effect was attenuated by calcitriol administration. Vasorelaxation of DHT-treated thoracic aortic rings was impaired following all relaxant agents. Impaired relaxation could be reversed by calcitriol application following acetylcholine in part, but did not affected following other agents. NO and COX blockers elucidate the relatively milder effects of calcitriol comparing to our earlier study on small arteries. PARP activity did not altered by vitamin D treatment in aorta, however, restored in ovaries and leucocytes, similarly as functional changes occurred. These studies show that the enhanced sensitivity to vasoconstrictors and impaired vasorelaxation in hyperandrogenic PCOS rats could be reversed by calcitriol treatment in part. PARP activity changed as functional parameters, which sign its' potential causal connection with these alterations.

11. Irodalomjegyzék

1. Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. (1995) Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(5):562-70.
2. Aavik E, doToi D, Myburgh E, Frösen J, Hayry P. (2001) Estrogen receptor beta dominates in baboon carotid after endothelial denudation injury. *Mol Cell Endocrinol*, 182:91-98.
3. Agarwal N, Rice SP, Bolusani H, Luzio SD, Dunseath G, Ludgate M, Rees DA. (2010) 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*, 95(2):722-730.
4. Alexandersen R, Haarbøj, Byrjalsen L, Lawaetz H, Christianzen C. (1999) Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated cholesterol fed rabbits. *Circ Res*, 84:813-819.
5. Andersen HL, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N. (1999) Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in rat aorta. *Br J Pharmacol*, 126:159-168.
6. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S. (Women's Health Initiative Steering Committee) (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 291:701-712.
7. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*, 279(13):12005-12008.

8. Appt SE, Clarkson TB, Lees CJ, Anthony MS. (2006) Low dose estrogens inhibit coronary artery atherosclerosis in postmenopausal monkeys. *Maturitas*, 55:189-197.
9. Arikan S, Akay H, Bahceci M, Tuzcu A, Gokalp D. (2009) 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*, 91:450-455.
10. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. (2000) A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2434-2438.
11. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. (2006) Androgen Excess Society: Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4237-4245.
12. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. (2004) The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:2745-2749.
13. Balen A. (2004) The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS and its endocrinology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18(5):685-706.
14. Baron AD, Laakso M, Brechtel G & Edelman SV. (1991) Mechanism of insulin resistance in insulin-dependent diabetes mellitus: a major role for reduced skeletal muscle blood flow. *J Clin Endocrinol Metab*, 73:637-643.
15. Barret-Connor EL, Cohn BA, Wingad DL, Edelman SV. (1991) Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischaemic heart disease in women than in men? The Rancho-Bernardo Study. *JAMA*, 265:627-631.
16. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S. & Ehrmann DA. (1989) Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 320:559-565.

17. Beloosesky R, Gold R, Almog B, Sasson R, Dantes A, Land-Bracha A, Hirsh L, Itskovitz-Eldor J, Lessing JB, Homburg R, Amsterdam A. (2004) Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med*, 14:207-215.
18. Bhathena RK. (2011) Insulin resistance and the long-term consequences of polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol*, 31(2):105-110.
19. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. (2006) A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 12:673-683.
20. Brawer JR, Munoz M, Farookhi R. (1986) Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biol Reprod*, 35:647-655.
21. Bremer AA, Miller WL. (2008) The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil Steril*, 89:1039-1048
22. Bremer AA. (2010) Polycystic Ovary Syndrome in the Pediatric Population. *Metab Syndr Relat Disord*, 8:375-394.
23. Brinkworth GD, Noakes M, Moran LJ, Clifton PM. (2006) Flow mediated dilatation in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*, 113(11):1308-1314.
24. Brismar K, Fernqvist-Forbes E, Wahren J, Hall K. (1994) Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3 and IGF-1 in insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:872-878.
25. Broekmans FJ, Fauser BC. (2006) Diagnostic criteria for polycystic ovarian syndrome. *Endocrine*, 30(1):3-11.
26. Bruck B, Brehme U, Gugel N, Hanke S, Finking G, Lutz C, Benda N, Schmahl FW, Haasis R, Hanke H. (1997) Gender specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17:2192-2197.
27. Buday A, Orsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Koller A, Ungvári Z, Gross ML, Benyó Z, Hamar P. (2010) Elevated systemic TGF-beta impairs

- aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299:H386-395.
28. Buffington CK, Kitabchi AE. (1994) Evidence for a defect in insulin metabolism in hyperandrogenic women with polycystic ovarian syndrome. *Metabolism*, 43:1367-1372.
 29. Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach K, Simpson R. (1997) Effect of testosterone and of estradiol in man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*, 337:91-95.
 30. Cardus A, Panizo S, Encinas M, Dolcet X, Gallego C, Aldea M. (2009) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. *Atherosclerosis*, 204:85-89.
 31. Castillo C, Castillo EF, López J, López RM. (2006) Testosterone inhibits the contractile responses to phenylephrine associated with the release of intracellular calcium in rat aorta. *Gac Med Mex*, 142(1):1-8.
 32. Chambliss K L, Yuhanna I S, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul P W. (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*, 16:938-946.
 33. Chiu KC, Chu A, Go VL & Saad MF. (2004) Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr*, 79:820-825.
 34. Ciaraldi TP, El-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SS. (1992) Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 65:577-583.
 35. Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SS. (1997) Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:1421-1425.
 36. Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CL McNeil JG, Poole-Wilson PA. (1995) 17-beta estradiol attenuates acetylcholine induced coronary arterial constriction in women, but not men with coronary heart disease. *Circulation*, 92:24-30.

37. Contreras C, Sánchez A, García-Sacristán A, Martínez MC, Andriantsitohaina R, Prieto D. (2011) Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis*, 217(2):331-339.
38. Conway GS, Agrawal R, Betteridge DJ, Jacobs HS. (1992) Risk factors for coronary artery disease in lean and obese women with the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 37:119-125.
39. Corbould A, Kim YB, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, Dunaif A. (2005) Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288:E1047-E1054.
40. Cornoldi A, Caminiti G, Marazzi G, Vitale C, Patrizi R, Volterrani M, Miceli M, Fini M, Spera G, Rosano G. (2010) 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*, 142(1):50-55.
41. Cussons AJ, Watts GF, Stuckey BG. (2009) Dissociation of endothelial function and arterial stiffness in nonobese women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 71(6):808-814.
42. Dellipizzi A, Pucci ML, Mosny AY, Deseyn K, Nasjletti A. (1997) 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*, 283:75-81.
43. Devin JK, Johnson JE, Eren M, Gleaves LA, Bradham WS, Bloodworth JR Jr, Vaughan DE. (2007) Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice. *J Mol Endocrinol*, 39:9-16.
44. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med*, 12:324-332.
45. Diamanti-Kandarakis E; Kandarakis H, Legro RS. (2006). The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine*, 30 (1):19-26.

46. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. (2012) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*, In press First published ahead of print Oct. 12 doi:10.1210/er.2011-2034.
47. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. (2006) Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 295:1288-1299.
48. Dokras A, Jagasia DH, Maifeld M, Sinkey CA, VanVoorhis BJ, Haynes WG. (2006) Obesity and insulin resistance but not hyperandrogenism mediates vascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 86:1702-1709.
49. Dokras A. (2008) Cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*, 26(1):39-44.
50. Dunaif A, Finegood DT. (1996) Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:942-947.
51. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. (1989) Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, 38:1165-1174.
52. Dunaif A. (1997) Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*, 18:774-800.
53. Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. (1995) Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest*, 96:801-810.
54. Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. (2001) Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281:E392-E399.
55. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield L. (1995) Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev*, 16:322-353.

56. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. (1999) Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, 22:141-146.
57. Ehrmann DA, Schneider DJ, Sobel BE, Cavaghan MK, Imperial J, Rosenfield RL, Polonsky KS. (1997) Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in woman with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:2108-2116.
58. Erdélyi K, Bakondi E, Gergely P, Szabó C, Virág L. (2005) Pathophysiologic role of oxidative stress-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation: focus on cell death and transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*, 62:751-759.
59. Faro R, Toyoda Y, McCully J, Jagtap P, Szabo E, Virag L, Bianchi C, Levitsky S, Szabo C. (2002) Protective effect on regional myocardial function and infarct size induced by PJ34: a novel poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor. *Ann Thorac Surg*, 73:575-581.
60. Fauser BC, Diedrich K, Bouchard P, Domínguez F, Matzuk M, Franks S, Hamamah S, Simón C, Devroey P, Ezcurra D, Howles CM. Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group (2011) Contemporary genetic technologies and female reproduction. *Hum Reprod Update*, 17(6):829-47.
61. Franks, S. (1989) polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 31:87-120.
62. Frank S, White D, Gilling SC, Carey A, Waterworth D, Williamson R. (1996) Hypersecretion of androgens by polycystic ovaries: the role of genetic factors in the regulation of cytochrom P450c-17 alpha. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 10:193-203.
63. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Weisinger JR, Li YC, Rodriguez-Iturbe B. (2008) Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int*, 74:1394-1402.
64. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. (2002) Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(7):883-896.

65. Ghafouri S, Hajizadeh S, Mani AR. (2011) Enhancement of insulin induced cutaneous vasorelaxation by exercise in rats? A role for nitric oxide and K(Ca²⁺) channels. *Eur J Pharmacol*, 652:89-95.
66. Gonzales RJ, Ghaffari AA, Duckles SP, Krause DN. (2005) Testosterone treatment increases thromboxane function in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(2):H578-585.
67. Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP. (2004) Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(2):H552-560.
68. Govind A, Obharl MS, Clayton RN. (1999) Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:38-43.
69. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. (2002) HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, 288:49-57.
70. deGroot PC, Dekkers OM, Romijn JA, Dieben SW, Helmehorst FM. (2011) PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 17(4):495-500.
71. Gullet H, Heeart AC, Delemer B, Gross A, Sulmont V, Leutenegger M, Caron J. (1993) Roles of LH and insulin resistance in lean and obese polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 38:621-626.
72. Hahn S, Ouchi Y, Karaki H, Orimo H. (1995) Inhibitory effects of insulin on cytosolic Ca²⁺ level and contraction in the rat aorta. *Circ Res*, 77:673-678.
73. Hahn S, Haselhorst U, Tan S, Quadbeck B, Schmidt M, Roesler S, Kimmig R, Mann K & Janssen OE. (2006) Low serum 25-hydroxyvitaminD concentrations are associated with insulin resistance and obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 114:577-583.
74. Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. (2004) Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod*, 71:66-72.

75. Hardie DG. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*, 144:5179-5183.
76. Hart R, Hickey M, Franks S. (2004) Definitions, prevalence and symptoms of polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18:671-683.
77. Hautanen A. (2000) Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24:S64-S70.
78. Hayes FJ, Taylor AE, Martin KA, Hall JE. (1998) Use of a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a physiologic probe in polycystic ovary syndrome: assessment of neuroendocrine and androgen dynamics. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:2343-2349.
79. Hodgin JB, Krege JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. (2001) Estrogen receptor α is a major mediator of 17- β estradiol's atheroprotective effect on lesion size in Apoe^{-/-} mice. *J Clin Invest*, 107:333-340.
80. Hojlund K, Glinborg D, Andersen NR, Birk JB, Treebark JT, Frosig C. (2008) Impaired insulin-stimulated phosphorylation of Akt and AS160 in skeletal muscle of women with polycystic ovary syndrome is reversed by pioglitazone treatment. *Diabetes*, 57:357-366.
81. Holick MF. (2007) Vitamin D deficiency. *New N Engl J Med*, 357:256-281.
82. Holte J, Bergh T, Berne C, Berglund L, Lithell H. (1994) Enhanced early insulin response to glucose in relation to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*, 78:1052-1058.
83. Holte J. (1996) Disturbances in insulin secretion and sensitivity in women with the polycystic ovary syndrome. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 10:221-247.
84. Horvath B, Orsy P, Benyó Z. (2005) Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. *J Cardiovasc Pharmacol*, 45:225-231.
85. Horváth EM, Benko R, Kiss L, Murányi M, Pék T, Fekete K, Bárányi T, Somlai A, Csordás A, Szabo C. (2009) Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative

- stress, activate poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 52(5):952-961.
86. Hughes C, Elgasim M, Layfield R, Atiomo W. (2006) Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome-progress so far: mini review. *Hum Reprod*, 21:2766-2775.
 87. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtalin SR. (2001) Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohortstudy *Lancet*, 358:1500-1503.
 88. Iftikhar S, Collazo-Clavell ML, Roger VL, Sauver JS, Brown Jr RD, Cha S, Rhodes DJ. (2012) Risk of cardiovascular events in patients with polycystic ovary syndrome. *Neth J Med*, 70(2):74-80.
 89. Iida S, Taguchi H, Watanabe N, Kushiro T, Kanmatsuse K. (2001) *Eur J Pharmacol*, 411:155-160.
 90. Isaia G, Giorgino R & Adami S. (2001) High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care*, 24:1496.
 91. Jasti P, Dunaif A. (2012) Reproduction and Metabolism: Insights from Polycystic Ovary Syndrome, *Endocrinol Metab* 27(3):180-190
 92. Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. (2004) Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res*, 35:103-108.
 93. Kakucs R, Várbió S, Nádasy GL, Ács N, Székács B, Monos E. (1998) Direct relaxing effect of estradiol-17 béta and progesterone on rat saphenous artery. *Microvasc Res*, 56:139-143.
 94. Kakucs R, Várbió S, Nádasy GL, Ács N, Monos E, Székács B. (2001) Acute, Nongenomic Vasodilatory Action of Estradiol Is Attenuated by Chronic Estradiol Treatment. *Exp Biol Med*, 226(5):538-542.
 95. Katsuaki O, Toshio K, Atsuhiko T, Katsuo K. (1999) Role of endothelium derived hyperpolarizing factor in insulin-induced vasodilatation in rat mesenteric artery *Jpn J Nephrol*, 41(7):685-691.
 96. Keller J, Mandala M, Casson P, Osol G. (2011) Endothelial dysfunction in a rat model of PCOS: evidence of increased vasoconstrictor prostanoid activity. *Endocrinology*, 152:4927-4936.

97. Kero JT, Savontaus E, Mikola M, Pesonen U, Koulu M, Keri RA, Nilson JH, Poutanen M, Huhtaniemi IT. (2003) Obesity in transgenic female mice with constitutively elevated luteinizing hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285:E812-E818.
98. Kiddy DS, Sharp PS, White DM, Scanlon MF, Mason HD, Bray CS, Polson DW, Reed MJ, Franks S. (1990) Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 32:213-220.
99. Kim JA, Jang HJ, Martinez-Lemus LA, Sowers JR. (2012) Activation of mTOR/p70S6 Kinase by ANG II Inhibits Insulin-Stimulated Endothelial Nitric Oxide Synthase and Vasodilation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302:E201-E208.
100. Kimura M, Jefferis AM, Watanabe H, Dusting JC. (2002) Insulin inhibits acetylcholine responses in rat isolated mesenteric arteries via non-nitric oxide nonprostanoid pathway. *Hypertension*, 39:35-40.
101. Kirchengast S, Huber J. (2001) Body composition characteristics and body fat distribution in lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, 16:1255-1260.
102. Kotsa K, Yavropoulou MP, Anastasiou O, Yovos JG. (2009) Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 92:1053-1058.
103. Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou SN, Kazakos N, Katsouras CS, Makrigiannakis A, Paraskevaidis EA, Chrousos GP, Tsatsoulis A, Michalis LK. (2005) Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:5088-5095.
104. Lakhani K, Constantinovici N, Purcell WM, Fernando R, Hardiman P. (2000) Internal carotid artery haemodynamics in women with polycystic ovaries. *Clin Sci (Lond)*, 98:661-665.
105. Lakhani K, Hardiman P, Seifalian AM. (2004) Intima-media thickness of elastic and muscular arteries of young women with polycystic ovaries. *Atherosclerosis*, 175:353-359.

106. Lakhani K, Leonard A, Seifailan AM, Hardiman P. (2005) Microvascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*, 20(11):3219-3224.
107. L'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon M-C, Ardevol R, Beehr V, Delkers W, Saez JM. (1996) Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:3892.
108. Lanzone A, Petraglia F, Fulghesu AM, Ciampelli M, Caruso A, Mancuso S. (1995) Corticotropin-releasing hormone induces an exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 63:1195-1199.
109. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. (2004) Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv*, 59:141-154.
110. Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. (1999) Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(1):165-169.
111. Legro RS, Strauss JF. (2002) Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 78(3):569-576.
112. Li M, Kuo L, Stallone JN. (2008) Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294:2444-2455.
113. Li HR, Brereton E, Anderson RA, Wallace R, Ho CK. (2011) Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 60(10):1475-1481.
114. Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustaffson JA, Mendelsohn ME. (1998) Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res*, 83:224-229.

115. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. (2009) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202:330-344.
116. Mabley JG, Horváth EM, Murthy KG, Zsengellér Z, Vaslin A, Benko R, Kollai M, Szabo C. (2005) Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(2):812-820.
117. Mabley JG, Wallace R, Pacher P, Murphy K, Szabó C. (2007) Inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase by the active form of vitamin D. *Int J Mol Med*, 19:947-952.
118. Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. (2006) Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci (Lond)*, 111(4):265-274.
119. Mannerås L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E. (2007) A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, 148:3781-3791.
120. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. (2010) The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 25:544-551.
121. Marchand KC, Arany EJ, Hill DJ. (2010) Effects of atorvastatin on the regeneration of pancreatic β -cells after streptozotocin treatment in the neonatal rodent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299:E92-E100.
122. McCredie RJ, Jane A, McCrohon M, Turner L, Griffith KA, Handelsman DJ, Celermajer DS. (1998) Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high dose androgens. *J Am Coll Cardiol*, 32(5):1331-1335.
123. McGee E, Sawetawan C, Bird I, Rainey WE, Carr BR. (1995) The effects of insulin on 3β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in human luteinized granulosa cells. *J Soc Gynecol Invest*, 2:535-541.
124. Mendelsohn ME, Karas RH. (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 340:1801-1811.
125. Mendelsohn ME, Karas RH. (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*, 308:1583-1587.

126. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. (2007) Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, 30:471-478.
127. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. (2005) Overweight women with polycystic ovary syndrome have evidence of subclinical cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:5711-5716.
128. Miller VM. (2010) Sex-based differences in vascular function. *Womens Health (Lond Engl)*, 6(5):737-752.
129. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428(6982):569-74.
130. Moghetti P, Castello R, Negri C, Tosi F, Spiazzi GG, Brun E, Balducci R, Toscano V, Muggeo M. (1996) Insulin infusion amplifies 17α -hydroxycorticosteroid intermediates response to ACTH in hyperandrogenic women: apparent relative impairment of $17,20$ -lyase activity. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:881.
131. Montaña LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M. (2008) Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology*, 149(5):2517-2526.
132. Morales AJ, Laughlin GA, Bützow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SSC. (1996) Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:2854-2864.
133. Moran L, Teede H. (2009) Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 15:477-488.
134. Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Koivunen RM, Ruokonen A, Tapanainen JS. (2000) Insulin sensitivity, insulin secretion, and metabolic and hormonal parameters in healthy women and women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*, 15:1266-1274.

135. Morrow DA, Brickman CM, Murphy SA, Baran K, Krakover R, Dauerman H, Kumar S, Slomowitz N, Grip L, McCabe CH, Salzman AL.(2009) A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial. *J Thromb Thrombolysis*, 27(4):359-64.
136. Mukherjee S, Maitra A. (2010) Molecular & genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Indian J Med Res*, 131:743-760.
137. Muniyappa R, Quon MJ. (2007) Insulin action and insulin resistance in vascular endothelium. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10(4):523-530.
138. Nagamani K, Chidvila V, Ramya S, Nargund L, Balakrishna V. (2012) Polycystic Ovary Syndrome: A Mysterious Ailment, *J Pharm Res*, 5(2):928-935.
139. Nahum R, Thong KJ, Hillier SG. (1995) Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum Reprod*, 10:75-81.
140. Naka KK, Kalantaridou SN, Kravariti M, Bechlioulis A, Kazakos N, Calis KA, Makrigiannakis A, Katsouras CS, Chrousos GP, Tsatsoulis A, Michalis LK. (2011) Effect of the insulin sensitizers Metformin and Pioglitazone on endothelial function in young women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized study. *Fertil Steril*, 95:203-209.
141. Natali A, Toschi E, Baldeweg S, Ciociaro D, Favilla S, Sacca L, Ferrannini E. (2006) Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes*, 55(4):1133-1140.
142. Nelson VL, Legro RS, Strauss 3rd JF, McAllister JM (1999) Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol*, 13:946-957.
143. Nestler JE, Jakubowicz DJ. (1996) Decreases in ovarian cytochrome P450c17 α activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 335:617-623.

144. New G, Berry KL, Cameron JD, Harper RW, Meredith IT. (2000) Long-term oestrogen treatment does not alter systemic arterial compliance and haemodynamics in biological males. *Coron Artery Dis*, 11:253-259.
145. Ngo DT, Chan WP, Rajendran S, Heresztyn T, Amarasekera A, Sverdlov AL, O'Loughlin PD, Morris HA, Chirkov YY, Norman RJ, Horowitz JD. (2011) Determinants of insulin responsiveness in young women: Impact of polycystic ovarian syndrome, nitric oxide, and vitamin D. *Nitric Oxide*, 25(3):326-330.
146. Nisenblat V, Norman RJ. (2009) Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 16(3):224-231.
147. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. (2007) Polycystic ovary syndrome. *Lancet*, 370:685-697.
148. O'Meara N, Blackman JD, Ehrmann DA, Barnes RB, Jaspan JB, Rosenfield RL, Polonsky KS. (1993) Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:1241-1247.
149. Orio F, Palomba S, Cascella T, De Simone B, Manguso F, Savastano S, Russo T, Tolino A, Zullo F, Lombardi G, Azziz R, Colao A. (2005) Improvement in endothelial structure and function after Metformin treatment in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome: Results of a 6-Month Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(11):6072-6076.
150. Orshal JM, Khalil RA. (2004) Gender, sex hormones and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286:233-249.
151. Osterlund KL, Handa LJ, Gonzalez RJ. (2010) Dihydrotestosterone alters cyclooxygenase-2 levels in human coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(4):E838-E845.
152. Ovalle F, Azziz R. (2002) Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril*, 77:1095-1105.
153. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Komjati K, Mabley JG, Szabó C (2002) The role of poly(ADP-ribose) polymerase in the development of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 40:1006-1016.
154. Pacher P, Szabó C. (2007) Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*, 25:235-260.

155. Pacher P, Szabó C. (2008) Role of the peroxynitrite-poly(ADP ribose)polimerase pathway in human disease. *Am J Pathol*, 173:2-13.
156. Pan Y, Cai B, Wang K, Wang S, Zhou S, Yu X, Xu B, Chen L. (2009) Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats. *J Ethnopharmacol*, 124:98-102.
157. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. (2002) Estrogen receptor alfa mediates the protective effects of estrogen against effects of vascular injury. *Circ Res*, 90:1087-1092.
158. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate Morselli AM, Venturoli S, Paradisi R, Zannarini L. (1993) Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism. *Horm Res*, 39:179-187.
159. Pasquali R, Casimirri F, Venturoli S, Labate M, Morselli AM, Reho S, Pezzoli A, Paradisi R. (1994) Body fat distribution has weight-independent effects on clinical, hormonal and metabolic features of women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 43(6):706-713.
160. Pasquali R, Casimirri F. (1993) The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 39:1-16.
161. Pasquali R, Vicennati V. (2000) Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in different obesity phenotypes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24:S47-S49.
162. Pasquali R, Vicennati V. (2000) The abdominal obesity phenotype and insulin resistance are associated with abnormalities of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *Horm Metab Res*, 32:521-525.
163. Perusquia M, Stallone JN. (2010) Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298:H1301-H1307.
164. Pessin JE, Saltiel AR. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106:165-169.
165. Petrányi Gy. (2008) Policisztás ovárium szindróma 2008-ban. *LAM* 18(6-7):490-492.

166. Phillippe M, Saunders T, Bangalore S. (1991) A mechanism for testosterone modulation of alpha-1 adrenergic receptor expression in the DDT 1 MF-2 smooth muscle myocyte. *Mol Cell Biol*, 100:79-90.
167. Pillay OC, Te Fong LFW, Crow JC, Benjamin E, Mould T, Atiomo W, Menon PA, Leonard AJ, Hardiman P. (2006) The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum Reprod*, 21:924-929.
168. Pittas AG, Lau J, Hu FB & Dawson-Hughes B. (2007) The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 92; 2017-2029.
169. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. (2006) Vitamin D and Calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 29:650-656.
170. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. (1988) Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (HepG2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab*, 67:460-464.
171. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. (1999) The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*, 20:535-582.
172. Poretsky L, Chandrasekher YA, Bai C, Liu HC, Rosenwaks Z, Giudice L. (1996) Insulin receptor mediates inhibitory effect of insulin, but not of insulin-like growth factor (IGF)-I, on IGF binding protein 1 (IGFBP-1) production in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:493-496.
173. Przybylski R, Mccune S, Hollis B, Simpson RU. (2010) Vitamin D deficiency in the spontaneously hypertensive heart failure [SHHF] prone rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20:641-646.
174. Puurunen J, Piltonen T, Morin-Papunen L, Perheentupa A, Järvelä I, Ruokonen A, Tapanainen JS. (2011) Unfavorable hormonal, metabolic, and inflammatory alterations persist after menopause in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:1827-1834.
175. Puurunen J, Piltonen T, Jaakkola P, Ruokonen A, Papunen L, Tapanainen JS. (2009) Adrenal androgen production capacity remains high up to menopause

- in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(6):1973-1978.
176. Rodin A, Thakkar H, Taylor N, Clayton R. (1994) Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. Evidence of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *N Engl J Med*, 330:460-465.
 177. Rosenfield RL. (1999) Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 28:265-293.
 178. Rosano GM, Gebara O, Sheiban I, Silvestri A, Waingarten M, Vitale C, Aldrighi JM, Ramires AF, Fini M, Mercurio G. (2006/a) Acute administration of 17-beta oestradiol reduces endothelin-1 release during pacing induced ischaemia. *Int J Cardiol*, 116:34-39.
 179. Rosano GM, Collins P, Gerbera O, Sheiban I, A, Waingarten M, Vitale C, Aldrighi JM, Ramires AF, Fini M, Mercurio G. (2006/b) Effect of estradiol 17 beta upon coronary artery vasoconstrictor response to methyleergometrinemaleate in female menopausal patients. *Int J Cardiol*, 107; 254-257.
 180. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome Society. *Fertil Steril*, 81:19-25.
 181. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. (2004) Pioglitazone treatment activates AMP activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 314:580-585.
 182. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GL, Varbiro S. (2012a) Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 97(2):462-468.
 183. Sara L, Nadasy G, Antal P, Monori-Kiss A, Szekeres M, Masszi G, Monos E, Varbiro S. (2012b). Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model - vascular effects of parallel vitamin D3 treatment. *Gynecol Endocrinol*, 28(12):961-964.
 184. Sasaki A, Emi Y, Matsuda M, Sharula, Kamada Y, Chekir C, Hiramatsu Y, Nakatsuka M. (2011) Increased arterial stiffness in mildly-hypertensive

- women with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Res*, 37(5):402-411.
185. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P (1994) Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest*, 94:2511-2515.
 186. Schulman IH, Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. (2007) Dissociation between metabolic and vascular insulinresistance in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293:H853-H859.
 187. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. (2005) Estrogen receptor beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H469-H476.
 188. Smith E, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*, 331:1056-1061.
 189. Soares GM, Vieira CS, Martins WP, Franceschini SA, dos Reis RM, Silva de Sá MF, Ferriani RA. (2009) Increased arterial stiffness in nonobese women with polycystic ovary syndrome (PCOS) without comorbidities: one more characteristic inherent to the syndrome? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1(3):406-411.
 190. Solomon CG. (1999) The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 28:247-263.
 191. Solorzano CMB, McCartney CR, Blank SK, Knudsen KL, Marshall JC. (2010) Hyperandrogenaemia in adolescent girls: origins of abnormal gonadotropin-releasing hormone secretion. *BJOG*, 117:143-149.
 192. Somogyi A, Sárman B. A polycisztás ovárium szindróma és a hyperinsulinemia kapcsolata. In: Hiperandrogén állapotok korszerű szemlélete. Magyar Szülészeti és Nőgyógyászati Endokrinológiai Társaság Budapest, (2000) 89-106.
 193. Sorensen MB, Franks S, Robertson C, Pennel DJ, Collins P. (2006) Severe endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome is

- only partially explained by known cardiovascular risk factors. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 65(5):655-659.
194. Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, and Szabó C. (2001) Rapid Reversal of the Diabetic Endothelial Dysfunction by Pharmacological Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Circ Res*, 89:684-691.
 195. Soyman Z, Noyan V, Tulmac M, Yucel A, Sagsoz N, Bayrak T, Bayrak A, Cakir E. (2011) Serum paraoxonase 1 activity, asymmetric dimethylarginine levels, and brachial artery flow-mediated dilatation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 95(3):1067-1072.
 196. Speer G. A PCOS patogenezise és epidemiológiája. In *Policisztás Ovárium Szindróma*. Budapest. Semmelweis Kiadó, 2009: 25, 27, 30-34.
 197. Stein IF, Leventhal ML. (1935) Amenorrhoea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol*, 29:181-191.
 198. Sudhír K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K, Rubanyi GM. (1997) Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen receptor gene. *Lancet*, 349:1146-1147.
 199. Sudhír K Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP, Malloy MJ, Korach KS, Rubanyi GM. (1997/a) Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation*, 96:3774-3777.
 200. Sullivan JM, Fowlkes LP. (1996) Estrogens, menopause and coronary artery disease. *Cardiol Clin*, 14:105-116.
 201. Szabo C, Pacher P, Swanson RA. (2006) Novel modulators of poly(ADP-ribose)polymerase. *Trends Pharmacol Sci*, 27:626-630.
 202. Szabó C. (2005) Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 315:812-820.
 203. Szilágyi A, Rossmanith WG (1991) Polycystisches Ovar-Syndrome: Zentrale oder periphere Regulations-Störung? *Zentralbl Gynäkol*, 113:851-856.
 204. Takács I, Benko I, Toldy E, Wikonkál N, Szekeres L, Bodolay E, Kiss E, Jambrik Z, Szabó B, Merkely B, Valkusz Zs, KovácsT, Szabó A, Grigoreff O, Nagy Zs, Demeter J, Horváth H Cs, Bittner N, Várbíró Sz, Lakatos P. (2012)

- Hazai konszenzus a D-vitamin szerepéről a betegségek megelőzésében és kezelésében *Orv Hetil*, 153 Szuppl (2).5-26.
205. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, McHugh-Pemu KP, Zborowski JV, Remsberg KE, Kuller LH. (2000) Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:2414-2421.
 206. Talbott EO, Zborowski JV, Rager JR, Boudreaux MY, Edmundowicz DA, Guzick DS. (2004) Evidence for an association between metabolic cardiovascular syndrome and coronary and aortic calcification among women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:5454-5461.
 207. Teede H, Deeks A, Moran L. (2010) Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med*, 8-41.
 208. The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 81:19-25.
 209. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A, Sarrel P, Bilezikian JP. (1999) Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids*, 64:430-435.
 210. Torres IP, El Hafidi M, Zamora-González J, Infante O, Chavira B, Banos G. (2007) Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome. *Life Sci*, 80:2170-2180.
 211. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. (2004) The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 60(1):1-17.
 212. Valkusz Zs, Korbonits M. (2010) Újabb eredmények a PCOS patofiziológiájában- az AMP-kináz szerepe a metabolizmus szabályozásában. *Magyar Nőorvosok Lapja*, 73:133-140.
 213. Várbíró Sz. A petefészkek élettani működése. In *Policisztás Ovárium Szindróma*. Budapest. Semmelweis Kiadó, 2009:17-24.
 214. Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. (2001) Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res*, 56:295-308.

215. Virag L, Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54:375-429.
216. Virág L. (2005) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol*, 3:209-214.
217. Volterrani M, Coats A, Beale C, Rosano G, Collins P. (1995) Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *Am J Med*, 99:119-122.
218. Von Shoultz B, Carlstrom K. (1989) On the regulation of sex-hormone-binding globulin. A challenge of old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem*, 32:327-334.
219. Voutilainen R, Franks S, Mason HD, Martikainen H. (1996) Expression of insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, and IGF receptor messenger ribonucleic acids in normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:1003-1008.
220. Visher UM. (1998) Insuline resistance and the regulation of vascular tone: is inuslin vasodilator? *Eur J Endocrinol*, 138:262-263.
221. Vitale C, Mercurio G, Cerquetani E, Marazzi G, Patrizi R, Pelliccia F, Volterrani M, Fini M, Collins P, Rosano GM. (2008) Time since menopause influences the acute and chronic effect of estrogens on endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:348-352.
222. Vrbikova J, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, Sindelka G, Hill M, Fanta M, Vondra K, Skrha J. (2004) Insulin Sensitivity in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2942–2945.
223. Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. (2012) Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*, 86(5):149:1-12.
224. Weishaar RE, Simpson RU. (1987) Vitamin D3 and cardiovascular function in rats. *J Clin Invest*, 79:1706-1712.
225. Wehr E, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. (2011) Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in PCOS women-a pilot study. *J Endocrinol Invest*, 34:757-763.
226. Wehr E, Pilz S, Schweighofer N, Giuliani A, Kopera D, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. (2009) Association of hypovitaminosis D with

- metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, 161(4):575-582.
227. Wild RA, Painter PC, Coulson PB, Carruth KB, Ranney GB. (1985) Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 61:946-951.
228. Wild RA. (1995) Obesity, lipids, cardiovascular risk, and androgen excess. *Am J Med*, 98:27S-32S.
229. Wild RA, Carmino E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, Dumesic DA. (2010) Assessment of Cardiovascular Risk and Prevention of Cardiovascular Disease in Women with the Polycystic Ovary Syndrome: A Consensus Statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society *J Clin Endocrinol Metab*, 95(5):2038-2049.
230. Willis D, Franks S. (1995) Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:3788-3790.
231. Williams JK, Delansorne R, Paris J. (1998) Estrogens, progestins and coronary artery reactivity in atherosclerotic monkeys. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65:219-224.
232. Wong MS, Delansorne R, Man RY, Svenningsen P, Vanhoutte PM. (2010) 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*, 299(4):H1226-H1234.
233. Wong MS, Delansorne R, Man RY, Vanhoutte PM. (2008) Vitamin D derivatives acutely reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(1):H289-H296.
234. Wu G, Meininger CJ. (2009) Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors*, 35(1):21-27.
235. Wuerst J H, Dry T J, Edwards J E. (1953) The degree of coronary atherosclerosis in bilaterally oophorectomized women. *Circulation*, 7:801-809.

236. Xita N, Tsatsoulis A. (2006) Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(5):1660-6.
237. Xu Z, Hu L, Cheng L, Qian Y, Yang Y. (2010) Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H₂O₂-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK. *Eur J Pharmacol*, 643:254-259.
238. Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, Zhang H, Lockhart R, Racusen LC, Reckelhoff JF. (2011) Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gend Med*, 8:103-115.
239. Yen SS. (1980) The polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 12:177-183.
240. Yildiz BO, Azziz R. (2007) The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Rev Endoc Metab Disord*, 8:331-342.
241. Yiu YF, Chan YH, Yiu KH, Siu CW, Li SW, Wong LY, Lee SW, Tam S, Wong EW, Cheung BM, Tse HF. (2011) 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*, 96(5):E830-E835.
242. Zawadzki J, Dunaif A. (1992) Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In *Polycystic Ovary Syndrome Current Issues in Endocrinology and Metabolism*. Edited by: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Marrian G. Boston, MA. Blackwell Scientific; 1992:377-384.
243. Zhang, LH, Rodriguez H, Ohno S, Miller WL. (1995) Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:10619-10623.
244. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108(8):1167-1174.

245. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. (2002) Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*, 295:505-508.
246. Zipitis CS, Akobeng AK. (2008) Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type-1 diabetes: a systematic review and meta analysis. *Arch Dis Child*, 93:512-517.

12. Saját irodalomjegyzék

12.1. A disszertáció témájában megjelent első szerzős közlemények

1. Masszi G, Buday A, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, Sara L, Revesz Cs, Benkő R, Nádasy Gy, Benyó Z, Hamar P, Varbiro Sz. (2013) Altered insulin induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone induced rodent model of polycystic ovary syndrome Fertil Steril. 99(2):573-578. DOI.10.1016/j.fertnstert.2012.09.024 2./ **IF:3,567**

12.2. A disszertáció témájában megjelent társszerzős közlemények

1. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy G, Varbiro S. (2012a) Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 97(2):462-468. **IF:3,567**

2. Sara L, Nadasy G, Antal P, Monori-Kiss A, Szekeres M, Masszi G, Monos E, Varbiro S. (2012b). Pharmacological reactivity of resistance vessels in a rat PCOS model - vascular effects of parallel vitamin D3 treatment. Gynecol Endocrinol. 28(12):961-964. (doi:10.3109/09513590.2012.683079) **IF:1,461**

3. Sára L, Nádasy G, Antal P, Szekeres M, Monori-Kiss A, Horváth EM, Tőkés AM, Masszi G, Monos E, Várbíró Sz. (2012c) Arteriolar biomechanics in a rat polycystic ovary syndrome model - Effects of parallel vitamin D3 treatment Acta Physiol Hung 99(3): 279-288. **IF: 0,821**

Egyéb közlemény a disszertáció témájában (elfogadva, megjelenés alatt)

Masszi G, Horvath EM, Tarszabo R, Benko R, Novak A, Buday A, Tokes AM, Nadasy LGY, Hamar P, Benyó Z, Varbiro S. (2012) Reduced Estradiol-Induced Vasodilation and Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Activity in the Aortas of Rats with Experimental Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)
PLOS ONE DOI.10.1371/journal.pone.0055589

IF: 4,092

12.3. Nem a disszertáció témájában megjelent közlemények

12.3.1. Cikk

1. Masszi G. (1997) A nők és az idősek hypertóniája. Orvostovábbképző Szemle IV(6):46-49
2. Masszi G. (1998) A hormonpótló kezelés és a hypertónia. *Cardiologia Hungarica*. 27(4): 9-64.
3. Masszi G. (2002) Hipertónia és menopauza *Orv. Hetil.* 143(51): 2821-2828.
4. Masszi G. (2006) A menopauza és a kardiovaszkuláris rizikó összefüggései *LAM* 16: 723-738.

12.3.2. Könyvfejezetek

1. Masszi G. Cardiovascularis rizikó és védelem a menopausában. In: Cseh I, Dancsó J, Tóth K S. (szerk.): A menopausa időszerű kérdései. B + V Kiadó, Budapest, 2000: 68-82.
2. Masszi G. A szív és érrendszeri megbetegedések prevenciója a változás kora után. In: Császár A, Masszi G (szerk.), *Nők a változó korban. Harc a Női Szívekért* Alapítvány, Budapest, 2011: 121-139.

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék őszinte köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek a munkámat és bíztak abban, hogy az eredményes lesz. A kutatómunka kísérletes, vizsgálati szakasza 2010 novemberétől - 2011 február végéig tartott, melyet a Klinikai Kísérleti Kutató és Humán Élettani Intézetben végezhattünk el.

Nagy hálával tartozom témavezetőmnek, a II. számú Nőgyógyászati Klinika adjunktusának, Dr. Várbíró Szabolcsnak, aki biztosította számomra a lehetőséget, és akinek a figyelme, kitartó együttműködése, ötletei, metodikai tanácsai, gondolati és gyakorlati támogatása mindvégig a legnagyobb segítséget nyújtotta számomra.

Külön szeretnék köszönetet mondani Benyó Zoltán professzor úrnak, az intézet vezetőjének, aki a szeretettel befogadáson túlmenően személyes segítséget is nyújtott a kísérletsorozat eredményeinek kiértékelésében, a közlemények ellenőrzésében és javításában és mindvégig szellemileg és erkölcsileg is támogatott.

Nagy tisztelettel köszönöm Monos Emil professzor úrnak a szívélyes fogadtatást és bátorítást, támogatást a kutatás végzésére.

Külön hálával tartozom Nádasy L. György docens úrnak, aki az elakadásoknál mindig biztos kézzel segített tovább és bármikor szívesen állt a rendelkezésünkre.

Köszönettel tartozom Dr. Zámolyi Károly főorvos úrnak, hogy mindvégig támogatott.

Köszönöm kollégáimnak, hogy a kutatások ideje alatt helyettesítettek és ezzel is támogatták kutatómunkám eredményességét. Köszönöm Dr. Kálmán Sándor főigazgató főorvos úrnak, hogy támogatta a munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Horváth Eszter Mária és Dr. Benkő Rita elméleti és gyakorlati segítségét a munka végzése során. Szívből köszönöm Dr. Hamar Péter segítségét a cikkek ellenőrzésében és javításában és munkacsoportjának a Kórélettan Intézetből, hogy a kutatásban részt vettek; Dr. Buday Annának, aki a laboratóriumi munkavégzés alapjaira tanított meg, és Révész Csabának az együttműködését.

Köszönettel tartozom Tarszabó Róbert és Novák Ágnes hallgatóknak, hogy a kísérletsorozat kivitelezésében tevékenyen részt vettek, a statisztikai elemzésben segítettek és az ábrák megrajzolásában is számíthattam rájuk, csakúgy, mint Dr. Sára Levente kutatótársamra, akinek szintén sok köszönettel tartozom.

Ezekon túlmenően szeretnék köszönetet mondani Dr. Ruisanchez Évának, Dr. Tőkés Anna-Máriának, a közös munkában végzett hathatós segítségükért.

Mindig hálával fogok emlékezni Nagy Zoltánné Évi néni, lelkiismeretes laborasszisztensi munkájára, Oravecz Lászlóné Ildikó áldozatkész segítségeire, és Balog Ibolya pontos titkárnői segítségnyújtására.

Végezetül szeretném megköszönni szüleimnek, hogy elültették bennem a tudás vágyát, férjemnek, Lacinak és gyermekeimnek, Zsoltinak és Ákosnak, testvéreimnek különösen is András öcsémnek, hogy a munka egészének folyamán mellettem álltak, bízattak és támogattak, akárcsak a barátaim.