

Endotél diszfunkció vizsgálata aortán, ateroszklerózis, és policisztás ovárium szindróma kísérleti modelljein

Doktori értekezés

Dr. Buday Anna

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Hamar Péter, egyetemi docens, Ph.D.,
MTA doktora
- Hivatalos bírálók: Prof. Dr. Rónaszéki Aladár, egyetemi
magántanár, Ph.D., Med.Habil.,
Dr. Zsembery Ákos, egyetemi adjunktus,
Ph.D.
- Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár,
Ph.D., MTA doktora
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ivanics Tamás, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Rácz Anita, szakorvos, Ph.D.

Budapest

2013

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék	2
2	Rövidítések jegyzéke	5
3	Bevezetés	8
3.1	Az endotél sejt szerepe a keringés szabályozásában	10
3.1.1	A nitrogén monoxid	13
3.2	Az endotél diszfunkció	15
3.2.1	Az oxidatív stressz	16
3.2.2	A NADPH oxidáz rendszer	18
3.2.3	Reaktív oxigén gyökök (ROS)	20
3.3	Az érrelmeszesedés patomechanizmusa	21
3.3.1	Hipertónia	24
3.3.2	A Policisztás Ovárium Szindróma (PCOS) és vaszkuláris vonatkozásai	25
3.4	A TGF- β család bemutatása	28
3.5	TGF- β élettani és kórélettani szerepe	29
3.5.1	Gyulladáscsökkentő hatások	30
3.5.2	Profibrotikus hatások	30
3.5.3	Extracelluláris mátrix szintézis	31
3.5.4	A szív és érrendszer fejlődésére kifejtett hatások	31
3.5.5	A TGF- β szerepe az érrelmeszesedésben	32
3.6	Állatmodellek	33
3.6.1	Az érrelmeszesedés APO-E knockout egérmodellje	33
3.6.2	A TGF- β transzgenikus egerek	35
3.6.3	A PCOS patkánymodellje	37
4	Célkitűzések	39
5	Módszerek	42
5.1	A kísérletek során használt egerek	42
5.1.1	APO-E knockout egerek (APO-E-KO)	42
5.1.2	A TGF- β transzgenikus egerek (TGF- β -TG)	42
5.1.3	Keresztezett, TGF- β -TGxAPO-E-KO törzs	42
5.1.4	Kontroll (C57BL/6)	43
5.2	TGF- β és TGF- β receptor immunhisztokémia egér aortában és TGF- β szint meghatározás ELISA-val	43

5.3	Szuperoxid kimutatás.....	44
5.3.1	Dihidroetidin festés	44
5.3.2	Konfokális mikroszkóp.....	44
5.4	Egérből izolált aortagyűrű funkcionális vizsgálata miográffal	45
5.5	Vérnyomásmérés in vivo egerekben.....	46
5.6	Morfológiai vizsgálatok egereken	47
5.6.1	Aorta morfometria	47
5.6.2	Szív morfológia; sztereológia, orientátor metódus.....	48
5.7	Zsírfestés egér aortában.....	50
5.8	Patkányok	51
5.8.1	DHT-nal kezelt patkányok (DHT)	51
5.8.2	DHT-nal és D-vitaminnal kezelt patkányok (DHT+D).....	51
5.8.3	Kontroll (álműtött) patkányok.....	52
5.9	Orális Glukóz Tolerancia Teszt, inzulin, fruktózamin szint meghatározás és testsúlymérés patkányokban.....	52
5.10	Patkányokból izolált aorta funkcionális vizsgálata miográffal	52
5.11	Patkány ováriumok szövettani vizsgálata	53
5.12	Statisztika	53
6	Eredmények	54
6.1	TGF- β és TGF- β receptor immunhisztokémia egér aortában és plazma TGF- β -szint meghatározás ELISA-val.....	54
6.2	Szuperoxid kimutatás.....	55
6.3	Egérből izolált aortagyűrű funkcionális vizsgálata miográffal	57
6.4	Vérnyomásmérés egerekben.....	58
6.5	Morfológiai vizsgálatok	58
6.5.1	Aorta morfometria	58
6.5.2	Szív morfológia, sztereológia.....	59
6.6	Zsírfestés egér aortában.....	60
6.7	Orális Glukóz Tolerancia Teszt, inzulin, és fruktózamin szint meghatározás és testsúlymérés patkányokban.....	62
6.8	A patkányból izolált aorta funkcionális vizsgálata	63
6.9	A patkány ováriumok szövettani vizsgálata.....	65
7	Megbeszélés	66
7.1	A TGF- β fokozza a ROS felszabadulást az NOX rendszeren keresztül, ami az endotél diszfunkciójához és az ateroszklerózis felgyorsulásához vezet.....	66

7.2	A TGF- β hosszútávon elősegíti a vérnyomás emelkedését, a plakk-képződést, és a szívizom fibrotikus átalakulását	68
7.3	A TGF- β emelkedett szintje, mint rizikófaktor humán betegségekben	70
7.4	A DHT-kezeléssel indukált policisztás ovárium szindróma patkány modellje	71
7.5	A hiperandrogén állapot vaszkuláris hatásai	72
7.6	A DHT-indukálta PCOS-ban romlik az inzulin-függő vazodilatáció.....	73
7.7	A D-vitamin védőhatása az ér-szintű, illetve szisztémás inzulinrezisztenciára, PCOS-ban.....	73
8	Következtetések.....	75
9	Összefoglalás.....	76
10	Summary	77
11	Irodalomjegyzék.....	78
12	Saját irodalom	97
13	Köszönetnyilvánítás	98

2 Rövidítések jegyzéke

ACE	Angiotenzin Konvertáló Enzim
ACh	Acetilkinolin
ALK-1	Activin Receptor-like Kináz 1
ANG II	Angiotenzin II.
APO-E	Apolipoprotein-E
APO-E-KO egér	Apolipoprotein-E deficiens egér
ATP	Adenozin-trifoszfát
BKCa	Kalcium-függő K-csatorna
BMI	Boday Mass Index - Testsúlytömeg index
BMP	Bone Morfogenetic Proteins - Csont Morfogenetikus Fehérjék
cAMP	Ciklikus Adenozin-Monofoszfát
CBH	Carbachol
cGMP	Ciklikus Guanozin-Monofoszfát
CNP	C-típusú Natriuretikus Peptid
COX	Ciklooxigenázok
CRP	C-Reaktív Protein
C57BL/6	C57 - Black 6 Egértörzs
CTGF	Connacting Tissue Growth Factor – Kötőszöveti Növekedési Faktor
DHE	Dihidroetidin
DHT	Dihidrotesztoszteron
DUOX	Dual Oxidázok
E ₂	Ösztrogén
ECM	Extracelluláris Mátix
EDHF	Endotél Eredetű Hyperpolarizáló Faktor
EDRFs	Endotél Eredetű Relaxáló Faktorok
EDCFs	Endotél Eredetű Kontraháló Faktorok
EMT	Epiteliális Mezenhimális Transzdifferenciáció

ET-1	Endotelin-1
FGF	Fibroblast Growth Factor – Fibroblaszt Növekedési Faktor
HDL	High Density Lipoprotein - Nagy Sűrűségű Lipoprotein
HO·	Hidroxil gyök
H ₂ O ₂	Hidrogénperoxid
HOCl ⁻	Hipoklórsav
IL-1, 6, 10	Interleukin 1, 6, 10
IFN α	Interfron α
IP	Prosztaciklin Receptor
LDL	Low Density Lipoprotein - Alacsony-denzitású Lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LO·	Alkoxi gyök
LOO ⁻	Lipid Peroxi Gyök
LRP	LDL-Related Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex - Fő Hisztokompatibilitási Komplex
NA	Noradrenalin
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NO	Nitrogénmonoxid
NO ₂	Nitrogén Dioxidgyök
NOS	Nitrogén Monoxid Szintáz
eNOS	Endoteliális Nitrogén Monoxid Szintáz
nNOS	Neuronális Nitrogén Monoxid Szintáz
iNOS	Indukálható Nitrogén Monoxid Szintáz
NOX	NADPH Oxidázok
O ₂ ⁻	Szuperoxid anion
ONOO ⁻	Peroxinitrit
oxLDL	Oxidált LDL
PCOS	Policisztás Ovárium Szindróma
PDGF	Platalet Derived Growth Faktor – Trombocita Eredetű Növekedési Faktor

PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin _{2α}
PGI ₂	Prostaciklin
PKB	Protein-kináz B
PKG	Guanozin-Monofoszfát-függő Protein-Kinázok
RAS	Renin-angiotenzin Rendszer
RNS	Reaktív Nitrogén Gyökök
ROS	Reaktív Oxigén Gyökök
SHBG	Szexuál Hormon Kötő Globulin
SHR	Spontán Hipertenzív Patkányok
SM-aktin	Simaizom Aktin
SMAD	Small (for small body size) Mothers Against Decapentaplegic - TGF-β Jelátviteli Molekulák
SOD	Szuperoxid Dizmutáz
SPF	Specified Pathogen Free - Ismert Kórokozótól Mentés
TGF-β	Transzformáló Növekedési Faktor Béta
TGF-β-TG egér	TGF-β Transzgenikus egér
TGF-β-TGxAPO-E-KO	Apolipoprotein-E és TGF-β-transzgenikus egér
TGR-I	TGF-β1 receptor
T2DM	II. típusú Diabétesz Mellitusz
TNF-α	Tumor Nekrózis Faktor - α
TP	Tromboxán Receptor
TXA ₂	Tromboxán A ₂
VCAM	Vascular Cell Adhesion Protein - Vaszkuláris Sejt Adhéziós Protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor - Vaszkuláris Endoteliális Növekedési Faktor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein - Nagyon Kis Sűrűségű Lipoprotein
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell - Vaszkuláris Simaizom Sejt (tenyészet)

3 Bevezetés

A népbetegségnek számító diabétesz, hipertónia, és ateroszklerózis súlyos, életet veszélyeztető szövödményeinek kialakulásában az egyik fontos tényező az érfal megbetegedése, az endotél diszfunkció. Az endotél diszfunkció háttérében gyakran áll oxidatív stressz, a reaktív oxigén gyökök (ROS) akut és krónikus túltermelése. A termelődő szabadgyökök a nitrogén monoxid (NO) megkötésével csökkentik annak biológiai hozzáférhetőségét. A NO hatásainak kiesése az endotél funkció zavarához, elsősorban az ér beszűkült relaxációs képességéhez vezet (1). A NO megkötése mellett a szabadgyökök indukálják az endotélium gyulladással járó átalakulását, az endotél sejtekben az adhéziós molekulák expressziója fokozódik, gyulladással járó sejtek tapadnak az aktivált endotélhez, amelyek gyulladással járó mediátorokat termelnek. A folyamat során az endotél relaxációs készsége csökken (2). Az oxidatív stressz következtében kialakuló endotél diszfunkció kritikus szerepet játszik az atherogenezis, illetve a magas vérnyomás kialakulásában, ami növeli kardiovaszkuláris betegségek kockázatát (3; 4).

A szív- és érrendszeri megbetegedések okozta halálozás az egyik leggyakoribb halálok. A fejlett gazdasággal, fejlett iparral, valamint fejlett egészségüggyel rendelkező civilizált országokban a halálozási gyakoriságnak több mint felét e betegségecsoport teszi ki. Az érlemezés a kockázati tényezők által okozott, elsődlegesen endotél réteget érintő, funkcionális, illetve mikro-anatómiai károsodás, és az erre adott lokális válaszok eredménye.

Az endotél gyulladással járó fenotípus változása során felszabaduló citokinek központi szerepet játszanak azoknak a sejtszintű változásoknak a kialakulásában, amelyek az érlemezésre jellemző fokozatos szerkezeti átalakuláshoz vezetnek (5). Az elmúlt évtizedekben fokozott figyelem irányult a növekedési faktorokra, különösen azokra, amelyek az érfal simaizomsejt-proliferációjáért felelősek. Ilyenek pl. a Trombocita Eredetű Növekedési Faktor (PDGF), és a Fibroblaszt Növekedési Faktor (FGF). A simaizomsejt-proliferáció felelős lehet az érlemezés felgyorsulásáért is. Később az immunmoduláló citokinek kerültek az érlemezés előterébe, pl. a TNF- α , vagy az IL-10. (6) Kiderült, hogy egyes citokinek, mint például a Transzformáló Növekedési Faktor

Béta (TGF- β), mind immunmoduláló, mind pedig sejtproliferációt befolyásoló hatásokkal rendelkeznek (7; 8).

A TGF- β a biológiai folyamatok széles körét befolyásoló, többfunkciós citokin. Meghatározó szerepet játszik többek között a sejtproliferációban, a sejt differenciálódásban, a szövetregeneráció és az extracelluláris mátrix (ECM) felszaporodásának szabályozásában, illetve a gyulladásos folyamatok és az immunválasz regulációjában. Paradox módon, gyulladáskeltő és gyulladáscsökkentő hatásai is ismertek. Gyulladás gátló hatásai alapvetően az infiltráló, immunregulátor T-sejtek lokális TGF- β termeléséhez köthetőek (7). A TGF- β serkenti a szöveti fibrotikus folyamatokat, nemcsak a vesében és a májban, hanem az erekben is (8). A fibrotikus folyamatok a májban kollagén lerakódás, a vesében glomerulonephritisz, az erekben vaszkulitisz, a szívben miokarditisz képében nyilvánultak meg (9).

A szisztémásan keringő TGF- β vaszkuláris hatásai azonban nem kellően tisztázottak. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a TGF- β serkenti a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidázok (NOX) aktivitását mind az endotél (10), mind a simaizom sejtekben (11). A NOX enzimes család a ROS termelő kaszkád-rendszer egyik legfontosabb kiinduló enzime, amely a fokozott szuperoxid (O_2^-) felszabadulásért felelős (12).

A TGF- β szerepe az érlemezésedés krónikus gyulladásos folyamatában évtizedek óta vitatott téma. Feltételezték, hogy a TGF- β gátolja az érlemezésedés folyamatát a lipid lerakódást gátló és gyulladáscsökkentő hatásának köszönhetően (13-15). Ugyanakkor számos tanulmány inkább aterogén szerepet tulajdonít a TGF- β -nak az endotél sejt regeneráció gátlása, az érfali oxidatív stressz fokozása, és a fibrózis serkentése miatt (16-18). Mindebből az következik, hogy a TGF- β szerepe az érlemezésedésben nagyon összetett és ellentmondásos folyamatok eredménye.

A legtöbb olyan betegség hátterében is az oxidatív stressz okozta endotél diszfunkció áll, amelyekhez a metabolikus folyamatok felborulása, a korai érlemezésedés, ill. a vaszkuláris szövődmények társulnak. Ilyen betegség például a Policisztás Ovárium Szindróma (PCOS) is. A PCOS-hoz társuló inzulinrezisztencia endotél diszfunkciót okoz, amelynek kiváltói az oxidatív stressz, és a NO termelés csökkenése (19).

A PCOS döntően genetikai eredetű betegség, azonban klinikai

manifesztációjához, ill. a tünetek súlyosbodásához olyan környezeti hatások is nagyban hozzájárulnak, mint az elhízás (20). A PCOS nevét a cisztákkal borított, megnagyobbodott ováriumokról kapta, de háttérében alapvetően az androgének termelésének túlsúlya áll (21). A betegség a szövettani elváltozások mellett számos kellemetlen panaszt okoz a PCO-szindrómás nőknek. Főbb tünetei közé tartozik a hirsutizmus, az amenorrea, a meddőség, továbbá olyan metabolikus elváltozások, mint például a hiperinzulinémia, és az inzulinrezisztencia. Az inzulinrezisztencia és hiperinzulinémia már a PCOS korai szakaszában jelen lehetnek, és jelentősen befolyásolhatják a betegség lefolyását, többek között tovább fokozzák az androgén termelést a mellékvesében és az ováriumban is (21; 22). Az inzulinrezisztencia hatására nő az inzulin elválasztás, csökken a glükóz tolerancia, végül II. típusú diabétesz mellitusz (T2DM) alakul ki. A PCO-szindrómás nőkben a T2DM, ill. a kardiovaszkuláris szövődmények sokkal korábban jelentkeznek, mint az átlag női populációban (23; 24).

A PCOS előfordulását többféle diagnosztikai kritérium-rendszer szerint értékelik. Az Androgén Excess Society (2009) legutóbbi ajánlása szerint a PCOS diagnózisa felállítható, ha hiperandrogenizmus, és ovárium diszfunkció (oligo-anovuláció vagy policisztás ovárium) áll fent, és a hiperandrogenizmus háttérében álló más betegségek kizárhatók (25). A PCOS előfordulása a reprodukzív korú nők körében mintegy 5-10%-ra becsülhető, és a meddőség leggyakoribb okának tekinthető (26). Ezért fontos, hogy minél alaposabban feltárjuk kialakulásának háttérében húzódo okokat, és mechanizmusokat, és így bővítsük a terápiás lehetőségek körét.

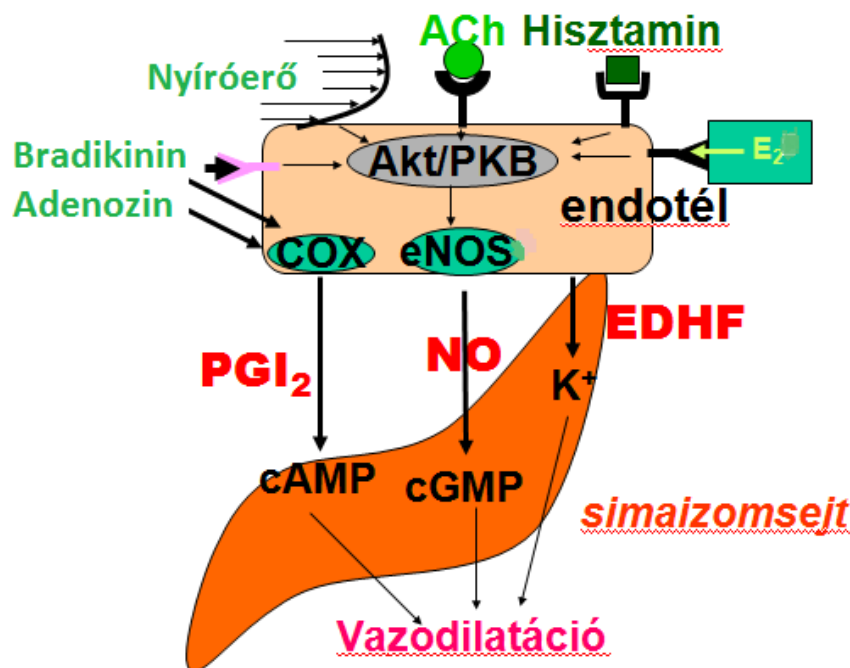
3.1 Az endotél sejt szerepe a keringés szabályozásában

A vaszkuláris endotél sejtek egy rétegben borítják az érfal lumen felőli részét. Az egészséges endotél alkotóeleme az érfalnak, és aktívan részt vesz a lokális keringés szabályozásában. Gyorsan reagál az éret érő fiziológiás stressz hatásokra, ezáltal fontos szerepe van az ér integritásának megőrzésében. Az endotél réteg a vaszkuláris tónus szabályozása mellett a vaszkuláris permeabilitás, a lokális anti-inflammatórikus és anti-trombotikus folyamatok fenntartásáért is felelős (27).

Az endotél sejt nemcsak közvetíti egyes vazóaktív anyagok hatását, hanem maga is vazodilatátorokat és vazokonstriktorokat termel. Ezeket összefoglaló néven endotél eredetű relaxáló faktoroknak (EDRFs), ill. endotél eredetű kontraháló faktoroknak (EDCFs) is szokták hívni. Legfontosabb endoteliális vazodilatátor a NO, amelyet L-argininből a nitrogén monoxid szintázok (NOS) állítanak elő. A NO a simaizomba diffundálva ciklikus guanozil-monofoszfát (cGMP)-függő vazodilatációt hoz létre (28), amelynek részletes mechanizmusát a következő fejezetben tárgyaljuk. Az endotél diszfunkció lényegi faktorának tekintik a NO biológiai elérhetőségének, vagy termelődésének csökkenését. A NO-függő vazodilatáció kiesése pedig számos klinikai tanulmány szerint szoros összefüggésben áll az ateroszklerózis kifejlődésével (29).

Az endotélben termelt másik jelentős vazodilatátor csoport az endotél eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF). Az EDHF-ek pontos kémiai szerkezete még nem ismert. Az EDHF-ek a membrán hiperpolarizációjával hoznak létre vazodilatációt. Ennek pontos mechanizmusa nem tisztázott. Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy az endotélium hiperpolarizációja K^+ kiáramlást okoz, amely a simaizom K^+ áteresztőképességét, és a Na^+/K^+ -ATPáz működését fokozza (30). A hiperpolarizáció végeredményben a rés-kapcsolatokon keresztül áterjed a simaizom sejtekre, és egy NO-független útvonalon okoz relaxációt a vaszkuláris simaizom sejtekben (31). Az EDHF így képes a NO-függő vazodilatáció kiesését részben kompenzálni (27).

Szintén az endotél sejtéből felszabaduló vazodilatátorok a C-típusú natriuretikus peptid (CNP), és a prosztaciklin (PGI_2). A CNP a guanil-cikláz aktiválásával okoz simaizom relaxációt és vazodilatációt (29). A PGI_2 egy trombocita-aggregációt gátló, ill. vazodilatátor hatású prosztanoid, amely részt vesz a glomerulus filtráció és a renin felszabadulás szabályozásában is. A ciklooxygenáz 2 (COX-2) enzim arachidonsavból prosztaglandin H_2 -t (PGH_2) állít elő, amelyet a prosztaciklin-szintáz alakít tovább PGI_2 -né. A PGI_2 az endotéliumban nagy mennyiségben expresszálódik, és acetilkolin (ACh), ill. adenzin nukleotidok (pl. ATP) által mediált relaxációt közvetít a prosztaciklin receptrokon (IP) keresztül, a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szint emelésével (32; 33). (1. ábra)



1. ábra: Az endotél-függő vazodilatáció

A különböző faktorok által mediált vazodilatáció

(E₂ = ösztrogén; Akt/PKB = proteinkináz B jelátviteli útvonal; ACh = acetilkolin; cAMP = ciklikus adenzin monofoszfát; cGMP = ciklikus guanozin monofoszfát; eNOS = endoteliális NOS; NO = nitrogén monoxid; EDHF = endotél eredetű hiperpolarizáló faktor; PGI₂ = prosztaciklin; COX = ciklooxigenáz)

Az endotélium eredetű vazokonstriktorok közül a legfontosabbak az angiotenzin II (ANG II), az endotelin, és a konstriktor hatású prosztanoidok: a tromboxán A₂ (TXA₂), és prosztaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (34).

Az ANG II erős vazokonstriktor, emellett fokozza a NADPH-rendszer aktivitását, így a ROS felszabadulást, és az endotelin termelést is (35). Az endotél sejtnak intrinzik renin-angiotenzin aktivitása is van a szívizomsejtekhez és a vese parenchima sejtjeihez hasonlóan (36). A renin-angiotenzin-rendszer (RAS) aktivációját több tényező okozhatja: a nyíróerő tartós fokozódása hipertóniában, fokozott renin termeléssel járó vesebetegségek, és az inzulinrezisztenciával járó kórképekben kialakuló hiperinzulinémia. A felsorolt állapotok következménye a fokozott oxidatív stressz, amely az endotél diszfunkciójához vezethet (37).

Az endotelint és szerepét az 1980-as évek végén írták le (38; 39). Az endotelin inaktív prekuzorból enzimatikus hasítás útján keletkezik, és összehúzza az artériákat és a vénákat. Termelését többek között a következő hormonok, ill. tényezők válthatják ki: adrenalin, ANG II, vazopresszin, inzulin, oxidált LDL, hipoxia, és a véráramlás csökkenése (40).

A TXA₂-t a tromboxán-szintáz termeli, a COX-1 hatására arachidonsavból képződött PGH₂-ből. A TXA₂ a vaszkuláris simaizom kontrakcióját, és trombocita aggregációt vált ki. Hatását tromboxán-receptorokon (TP) fejt ki, amelyek az intracelluláris Ca²⁺szint emelésével okoznak simaizom kontrakciót (41). ROS-ök hatására a TP receptorok stabilitása fokozódik a sejtmembránban (42). Továbbá a TP receptorok aktivációja gátolja a NO termelést az endotél sejtben (43). A PGF_{2α} szintén az intracelluláris Ca²⁺szintet emeli, erős vazokonstriktor hatású prosztaglandin, amely aterogén hatású, ill. a hipertónia és a szívmeagnagyobbodás kialakulásában is szerepe lehet (44; 45).

3.1.1 A nitrogén monoxid

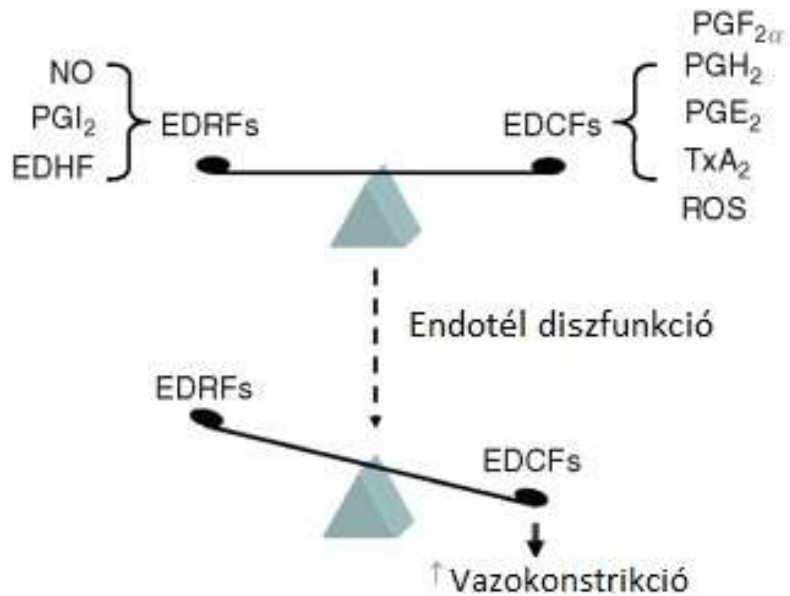
A NO gáz halmazállapotú, erősen lipoldékony molekula, amely oldatba kerülve szabadgyökként viselkedik. Képződése után gyorsan elbomlik, nitritté és nitráttá redukálódik. A szervezetben keletkezett NO meghatározására használatos módszer a plazma és a vizelet nitrit és nitrát tartalmának mérése (46). Mióta felfedezték a NO-t és szerepét a keringésszabályozásban, a tudományos kutatások egyik legélénkebben tanulmányozott célpontjává vált. *Furchgott és Zawadski* 1980-ban írták le, hogy az ACh értágító hatása csak ép endotéllel bíró éren lép fel (47). Az akkor még ismeretlen anyagot endotél eredetű relaxáló faktornak (EDRF) nevezték el. *Moncada és munkatársai* 1987-ben mutatták ki, hogy az endotélium L-argininből NO-t képez, és a NO közvetíti az ACh értágító hatását (48). További kutatások kimutatták, hogy ez a hatásmechanizmus egységesen megtalálható az erekben, így működik rezisztencia ereken is (49).

Az L-arginin fiziológias szubsztrátja a NOS enzimnek (50), amelyeknek három izoformája ismert. A neuronális NOS (nNOS, NOS1), az indukálható NOS (iNOS, NOS2) és az endoteliális NOS (eNOS, NOS3) (51). Az eNOS és nNOS folyamatosan expresszálódik, az aktivációja Ca^{2+} -calmodulin-függő. Ezek az izoformák felelősek a sejtek kis mennyiségű, alapszintű NO termelésért. Ezzel ellentétben az iNOS működése transzkripciós szinten szabályozott, Ca^{2+} -calmodulin független (52). Ez az izoforma a gyulladással sejtben citokinek hatására aktiválódik, és nagy mennyiségű, lokális NO felszabadulásért felelős. Az inaktív eNOS caveolin fehérjéhez kötődik, és a sejtmembrán falán lévő caveolákban helyezkedik el. Ha az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedik, az eNOS leválik a caveolin fehérjéről, és így kerül aktivált állapotba (53).

A NO termelést többféle fiziológias ill. patológias mechanizmus szabályozza. Az egyik ilyen mechanizmus az érfalat érő nyíróerő, ill. annak fokozódása (54). A nyíróerő a fokozott áramlás következtében lép fel, ennek köszönhetően az endotél sejt felszínén lévő Ca^{2+} -csatornák aktiválódnak, így az eNOS foszforilálódik, és növekszik a NO termelés (55). A szintetizálódott NO az érfal simaizom sejtjeibe jutva a guanilat-cikláz enzimhez kapcsolódik (56), így megemeli a cGMP szintet. A cGMP a cGMP-függő protein-kinázokat (PKG) aktiválja (29). A PKG-ok IP_3 -receptor foszforilációján keresztül csökkentik a Ca^{2+} kiáramlást az endoplazmatikus retikulumból, a miozin könnyűláncot foszforilálják, és a Ca^{2+} -függő K-csatornák (BKCa) aktiválásával hiperpolarizálják a membránt, így több ponton gátolják a simaizom kontrakcióját (28; 57). A leírt mechanizmusok fenntartják a NO termelést, ezáltal a vazodilatátor tónust, és végeredményben a simaizom tónusát csökkentik.

Amennyiben a NO termelést gátoljuk, a vérnyomás dózisfüggően emelkedik, amely azonnal helyreáll NO adagolás következtében (58). Ezek a tények rámutatnak a NO szerepének fontosságára a nyugalmi vazodilatátor tónus fenntartásában, és a vérnyomás szabályozásában.

A legfontosabb anyagok, amelyekről kimutatták, hogy endotélium eredetű NO felszabadításával vazodilatációt okoznak: ACh (48), adenin-nukleotidok (59), hisztamin, bradikinin, arginin-vazopresszin, ösztrogén, oxitocin, Ca^{2+} -ionoforok, P-anyag (60), inzulin (61), szomatosztatin (62).



2. ábra: A legfontosabb endotélium eredetű vazorelaxánsok (EDRFs) és vazokonstriktorok (EDCFs) (63)

Ha a vazokonstriktorok és vazodilatátorok egyensúlya felborul, endotél diszfunkció és az erek tartós összehúzódása jöhet létre.

(NO = nitrogénmonoxid, PGI₂ = prosztaciklin, EDHF = endotél eredetű hiperpolarizáló faktor, PGF_{2α} = prosztaglandin 2α, PGH₂ = prosztaglandin H₂, PGE₂ = Prosztaglandin E₂, TXA₂ = tromboxán, ROS = reaktív oxigén gyökök)

3.2 Az endotél diszfunkció

Az endotél diszfunkció kialakulása lényegében a NO hozzáférhetőségének csökkenésével, ill. az endotél eredetű vazorelaxánsok és vazokonstriktorok egyensúlyának felborulásával összefüggő folyamat (29). (2. ábra) Az endotél diszfunkcióját sok tényező válthatja ki.

Az endotél diszfunkció kialakulásában kulcsfontosságú szerepe van a fokozott oxidatív stressznek. A túlzott O₂⁻ termelés következtében a NO-ból peroxinitrit keletkezik, amely maga is szabadgyökként viselkedik, és a O₂⁻-dal együtt képes a cGMP útvonalat blokkolni. Így a túlzott ROS termelés nem csak a NO szint csökkentésével, hanem a NO-mediálta útvonal gátlásán keresztül is az endotél-függő vazodilatáció

romlásához vezet (28). ROS túltermeléssel együttesen fennálló hiperkoleszterinémia esetén a szubendotéliumba kerülő alacsony-denzitású lipoprotein (LDL) részecskék is oxidálódnak. Az így keletkezett oxidált LDL (oxLDL) maga is fokozza újabb ROS-ök termelését, továbbá fokozza az endotelin termelést, így a vazokonstriktiót. Mindemellett az oxLDL-t a scavenger receptorokon keresztül, szabályozás nélkül veszik fel a makrofágok, ami „habos-sejt” képződéshez, az ateroszklerózis egyik korai lépéséhez vezet (64).

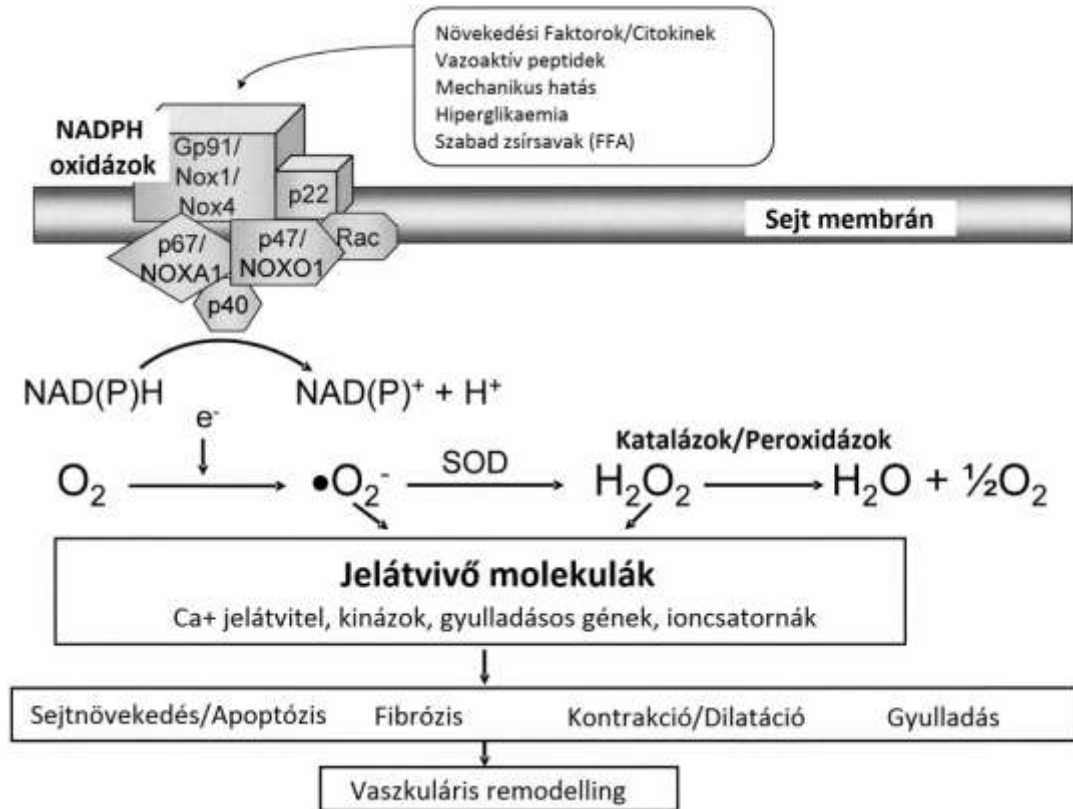
A hipertónia a nyíróerő fokozódásán keresztül az endotél sérülését okozza. A nyíróerő növekedés tartóssá válásával az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak kimerülnek, aminek következtében a NO termelés csökken (58). Emellett, a hipertónia legtöbb típusában aktiválódik a RAS, ami együtt jár a fokozott ROS termeléssel, az endotél sejt mikrotubuláris átrendeződésével, és a gyulladásos folyamatok felerősödésével (65).

Számos tanulmány alátámasztja az oxidatív stressz gyulladást felerősítő hatását (66; 67). Egyre több kutató feltételezi azonban, hogy a lokális gyulladásos folyamatok következtében a NOX rendszer aktiválódik a mieloperoxidázok hatására, és ezért tovább fokozódik az oxidatív stressz (68; 69). Tehát az újabb elképzelés szerint a gyulladás és az oxidatív stressz egymást erősítve, „circulus vitiosus”-ként működik (70).

3.2.1 Az oxidatív stressz

A legtöbb érkárosodással járó megbetegedés, mint a diabétesz, a hipertónia, az ateroszklerózis összefüggésbe hozható az endotél diszfunkciójával, ami a NO csökkent biológiai hozzáférhetőségére vezethető vissza. A NO protektív hatásainak kiesésével az érbetegségek valószínűsége megnő, mivel az emelkedett szuperoxid termelés az endotél funkció zavarához, és oxidatív stresszhez vezet (3). Az oxidatív stressz a szívizmot is érinti. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) szívizom-specifikus kiütése egerekben kardiomiopátiához és szívizom-fibrózishoz vezet (71; 72). A szívizmot érintő oxidatív stressz növekszik humán szívelégtelenségben is (73). A ROS-ök ECM és kollagén lerakódást okoznak, módosítva a miokardium fibroblasztjait és aktiválva a mátrix metalloproteinázokat, amit részben a TGF- β közvetít a MAP kinázokon keresztül (11).

A ROS termeléséért felelős legfontosabb enzimek: a NOX, a mitokondriális légzési lánc enzimeit, a ciclooxygenázok, a lipoxigenázok, és a xantin oxidázok (74). A vaszkulátúra legfontosabb ROS forrása a NOX rendszer (75).

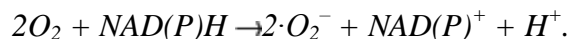


3. ábra A NOX-ok hatásmechanizmusa (76)

A különböző faktorok által létrejövő NOX aktiváció következménye a szuperoxid felszabadulás, amely különböző jelátviteli molekulák felszabadításán keresztül érnövekedést, fibrózist, ill. vazokonstriktiót/vazodilatációt közvetít (Gp91, p22, p67, p47, p40 = NADPH oxidáz enzimek alegységei, SOD = szuperoxid dizmutáz, NADPH = Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát, $\cdot\text{O}_2^-$ = szuperoxid, H_2O_2 = hidrogénperoxid)

3.2.2 A NADPH oxidáz rendszer

A NOX-ok több alegységgel (p22, p40, p47, p67, rac, Gp91) rendelkező enzimek, amelyek a NADPH-ról a molekuláris oxigénre visznek át egy elektront, és ezzel O_2^- -t, ill. különböző ROS-t képeznek. (3. ábra)



A ROS-t bővebben a következő fejezetben tárgyaljuk.

A NOX enzimek prototípusát a neutrofilekben fedezték fel, ezt NOX2-nek nevezik. Számos homológja létezik nem fagocitáló sejtekben is. A NOX típusai: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5 és a dual oxidázok: DUOX1, DUOX2. Expressziójuk széles szöveti eloszlást mutat (77). A NADPH oxidázok elsősorban az immunvédekezés fontos enzimei. A fagocitáló sejtekben a NOX eredetű ROS-ök a bakteriális ölő mechanizmusban játszanak fontos szerepet, a nem fagocitáló sejtekből pedig citokinek és növekedési faktorok hatására szabadulnak fel. A fibroblasztokban növekedési faktorok hatására indul meg a NOX indukálta ROS termelés. A NOX1 megtalálható a vastagbél, ill. az érrendszeri sejtekben, a NOX2 a fagocitákban található, de emellett megtalálható a szívben és a vesében. A NOX3 főleg magzati szövetekben, a NOX4 főleg a vesében (renox) van jelen, de az erekben és az osteoklasztokban is megtalálható. A NOX5 az erekben és a limfoid sejtekben fordul elő. A Doux1 és a Doux2 a pajzsmirigy hormonszintézisében vesznek részt (76). (1. táblázat)

A NADPH oxidázok túlzott aktivitása a ROS túltermeléséhez, és az oxidatív stressz kóros fokozódásához vezet. A NOX rendszer stimulációját különböző humorális faktorok válthatják ki: az ANG II, a gyulladáscitokinek (IL-1, IL-6), a $TNF\alpha$, a $TGF-\beta$, az oxidált foszfolipidek, és a glikolizált végtermékek. A NOX-ok túlzott működése következtében a szabadgyök termelés és az antioxidáns védelem egyensúlya felborul, az antioxidáns rendszer enzimatikus és nem enzimatikus komponensei elhasználódnak.

I. táblázat: NOX enzimek szöveti előfordulása (78)

	Termelés legfőbb helye	Termelés kis mennyiségben
NOX1	Vastagbél	Sima izom, endotélium, méh, placenta, prosztatata
NOX2	Fagociták	B limfocita, neuronok, szívműködő sejtek, hepatociták, endotélium, hematopoetikus őssejtek, sima izom
NOX3	Belső fül	Magzati vese, magzati lép, koponyacsontok, agy
NOX4	Vese, erek	Osteoklasztok, endotélium, sima izom, hematopoetikus őssejtek, fibroblasztok
NOX5	Limfoid szövet, here	Endotélium, sima izom, hasnyálmirigy, placenta, ovárium, méh, gyomor
DUOX1	Pajzsmirigy	Légutak epitéliuma, nyelv epitéliuma, kisagy, here
DUOX2	Pajzsmirigy	nyálmirigyek, gasztrointesztinális epitélium, méh, húgyhólyag, hasnyálmirigy

A NO-ból peroxinitrit képződik, így az endotél funkció romlik. Az eNOS különösen érzékeny peroxinitrit jelenlétére, mivel a peroxinitrit a cink-tiolát hidat felbontva megváltoztatja az eNOS szerkezetét, és így az enzim NO helyett szuperoxidot termel. (79) A peroxinitrit ezen kívül az eNOS koenzimét, a tetrahidrobiopterint (BH₄) is oxidálja, így az eNOS alulműködése következtében tovább csökken a NO termelés (28). A lokális gyulladásos folyamatok felerősödnek, gyulladásos citokinek szabadulnak fel, amelyek közül a TNF α közvetlenül is fokozza a NADPH oxidázok aktivitását. Emellett az aktivált makrofágokból is újabb ROS felszabadulás várható. ROS jelenlétében az LDL részecskék oxidálódnak, és az így keletkező oxLDL-nek fontos szerepe van a "habos sejt" képződésben, és további gyulladásos folyamatok generálásában (5; 64). ROS hatására az endotél mikrotubulus rendszere is átalakul, és a különböző növekedési faktorok (pl. PDGF) termelése következtében megkezdődik az érfali simaizom szöveti átalakulása (remodelling) is (78). Mindezen tényezők összességében az ateroszklerózis felgyorsulásához, és a kardiovaszkuláris rizikó emelkedéséhez vezetnek.

3.2.3 Reaktív oxigén gyökök (ROS)

A ROS-ök olyan oxigén metabolitok, amelyek vagy felvesznek (oxidálnak), vagy leadnak egy elektront (redukálnak), vagy reakcióba lépnek más molekulákkal (oxidatív reakció). A ROS-ök párosítatlan elektront hordoznak, ezért hívjuk őket gyököknek. Különösen fontos szabadgyök a kardiovaszkuláris biológia szempontjából a szuperoxid anion (O_2^-), amely egy elektrontöbbletes (redukált) oxigén molekula. A szuperoxid anion jelentősége abban rejlik, hogy redukáló és oxidáló molekulaként is működhet a biológiai rendszerekben, és maga is könnyen átalakulhat más szabadgyök tulajdonságú molekulává. Ilyenek pl. hidroxil gyök ($\cdot HO$), lipid peroxi-gyök ($ROO\cdot$), alkoxi-gyök ($LO\cdot$). Az egyéb olyan molekulák, amelyek peroxinitritet ($ONOO^-$), hypoklór-savat ($HClO$), és hidrogénperoxidot (H_2O_2) tartalmaznak nem nevezhetők szabadgyököknek, de erős oxidatív hatásuk miatt a ROS-ök közé soroljuk őket.

A ROS másik nagy csoportja a reaktív nitrogén gyökök (RNS), amelyek között tartjuk számon a NO-t, a nitrogén dioxid gyököt (NO_2), és a nitrozónium kationt (NO^+). A peroxinitrit a O_2^- és NO között létrejövő reakció kapcsán keletkezik limitált mennyiségben, és ROS-ként és RNS-ként is felfogható. A RNS-ek gyakran reagálnak fehérjékkel, vagy módosítják szerkezetüket, így módosítva azok funkcióit (80). A RNS-ek különböző fehérje molekulák tirozin oldalláncaival létrejött reakciója során a tirozin oldalláncok nitrálódnak, nitrotirozin molekula jön létre, aminek a kimutatása a lezajlott oxidatív stressz mértékét jelző eljárás (81).

A ROS kimutatására többféle módszer alkalmas. Lucigenin-chemilumineszcenciával szelektíven az egyik legfontosabb szabadgyököt, a O_2^- -t detektálhatjuk. Érzékenysége vitatott, de a lucigenin megfelelő koncentrációit alkalmazva az egyik legalkalmasabb módszernek tekintik. A luminol-chemilumineszcencia kevésbé szelektív, kimutatja a O_2^- -n kívül a H_2O_2 -t és a $\cdot HO$ -t is, de megfelelő scavengerek használatával meghatározható, mely ROS felszabadulása a legjelentősebb az adott szövetben. A fluoreszcens módszerek közül a legnépszerűbb jelenleg a dihidroetidin-festés. A dihidroetidin szinte teljesen O_2^- specifikus, csak kismértékben reagál a $\cdot HO$ -val és a H_2O_2 -al is. Ez a módszer mind fagyasztott, mind élő szöveten használható, továbbá megfelelő képalkotó eljárással az érfal egyes rétegeinek

ROS termelése külön-külön is vizsgálható. Az enzimatisz módszerek közül a spektrofotometriás citokróz-c-redukciós teszt az egyik, amelyik specifikus a O_2^- -ra, azonban csak az extracelluláris tér ROS termelésének vizsgálatára alkalmas. (82)

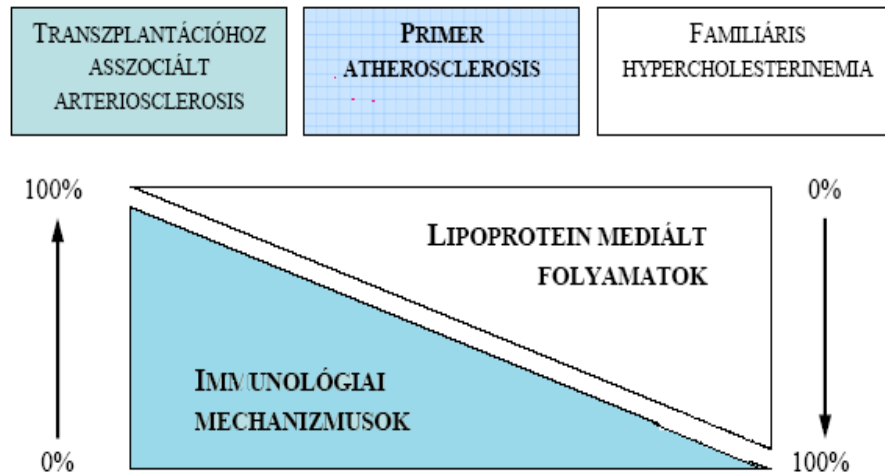
3.3 Az érelmeszesedés patomechanizmusa

Az érelmeszesedés pontos patomechanizmusa nem ismert. Számos elmélet és kísérleti adat alapján az endotél sérülése, funkciójának csökkenése elsődleges szerepet játszik az érelmeszesedési folyamatok beindításában. Az endotél károsodása következtében gyulladászos folyamatok indulnak be az érfalban. A gyulladást elsősorban az abban részt vevő sejtek, így az endotél, a simaizomsejt, a fibroblaszt, a monocita, és a limfociták kölcsönhatása határozza meg. A nem sejtes elemek közül, a plazmában lévő elemeken kívül (véralvadás faktorok, akut fázis proteinek, citokinek), a szubendoteliális területen elhelyezkedő kötőszöveti mátrix, és a lokálisan kialakuló vazokonstriktor-vazorelaxáns, hemosztatikus, és oxidatív egyensúly játszik ebben döntő szerepet. Az érelmeszesedés pontos oka és a kialakulás folyamata azonban nem ismert. Kialakulásával kapcsolatban több lehetséges mechanizmust leírtak.

Magas vérkoleszterin szint esetén, például olyan apolipoprotein-E (APO-E) fenotípus esetén, amikor az APO-E szint alacsony, vagy APO-E knockout (APO-E-KO) egerekben, a magas lipid szint önmagában is kiválthatja az érelmeszesedést (83). A spektrum másik végén a gyulladászos folyamatok képesek lipid lerakódás nélkül is média és intima proliferációt okozni, pl. transzplantált szervekben, ahol felgyorsult ateroszklerózis figyelhető meg (84; 85). A népbetegségnek számító primer érelmeszesedésben valószínűleg mind a két folyamat (lipid lerakódás és gyulladás az érfalban) szerepet játszik. A rossz szociális körülmények kedveznek az ateroszklerózis kialakulásának („szegény ember”), hiszen magasabb az étrend zsírtartalma (olcsó energiaforrás), és gyakoribbak a fertőzések, ami az endotél gyulladászos fenotípus váltásának kedvez (86).

A 4. ábrán bemutatott két fő lehetséges patomechanizmus szerint az ateroszklerózis kialakulhat tisztán genetikailag kódolt lipid eltérések következtében, pl. kísérleti állatmodellben APO-E hiányában. Ebben az esetben a lipid lerakódás és „habos

sejt” képződés szerepelhet elsődleges tényezőként. Ugyanakkor kialakulhat transzplantációs ateroszklerózis is, amely elsősorban egy gyulladásos, T-sejt-mediált folyamat.



4. ábra: Az érlemezésedés fő elméleteinek összefoglalása (86)

Az egyik oldalon a magas lipid szint szerepel, amely önmagában is kiválthatja az érlemezésedést. A spektrum másik végén a gyulladásos folyamatok állnak, amelyek képesek lipid lerakódás nélkül is média és intima proliferációt okozni, pl. transzplantált szervekben. Primer érlemezésedésben valószínűleg mind a két folyamat szerepet játszik.

Az elmúlt 15 évben dolgozták ki az ateroszklerózis immunológiai magyarázatát (87; 88). Az elmélet alapjául olyan korai artériás elváltozások szolgáltak, amelyek még nem okoznak klinikai tüneteket. Az eredmények szerint, az artéria intimájának azon predisponált helyein, ahol később valószínű az ateroszklerotikus léziók kialakulása, az elsőként megjelenő sejttípusok nem a „habos sejtek” voltak (88). A nagyon korai léziókban, a „habos sejtek” megjelenése előtt már megfigyelhető gyulladásos sejtes infiltráció az érlemezésedés predilekciós helyein: a nagy erek kiágazásánál az aortából, karotiszból, stb. Ezeken a helyeken a vér áramlása fiziológias körülmények között is gyorsabb, mint máshol, így turbulens lehet, ami fokozott nyíróerőt jelent az endotél számára. Ez a nyíróerő, és más, a szervezetben zajló gyulladásos folyamatok az endotélt aktiválják. Az aktivált, gyulladásos fenotípusú endotélre jellemző a Fő

Hisztokompatibilitási Komplex (MHC) és az adhéziós molekulák fokozott expressziója. A szelektin és a fenotípus váltás során megjelenő integrin típusú adhéziós molekulák leukociták kitapadását, és az érfalba történő infiltrációját eredményezik. Ez a „steril” gyulladás lehet az érlemezés kialakulásának első lépése (87).

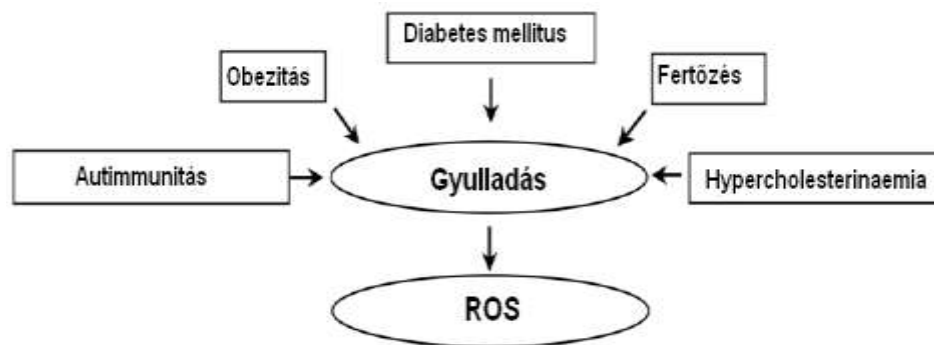
A citokinek közül az IFN- α rendelkezik proinflammatorikus, így aterogén hatásokkal. Az IFN- α a T-sejteken keresztül aktiválja a makrofágokat, gátolja a simaizom-felszaporodást és a kollagén szintézist, így a plakk instabilitásának fokozódásához vezethet. Ezzel ellentétben a gyulladáscsökkentő TGF- β citokinről, amelyet a makrofágok, a simaizomsejtek és a Th3 sejtek termelnek, úgy tartják, hogy profibrotikus hatásainak köszönhetően elősegíti a stabil plakk kialakulását (15).

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a krónikus és akut ROS túlprodukciónak is jelentős szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. A ROS-ök felerősítik az aterogenezis gyulladásos komponenseinek hatását, a zsíros csík képződésétől, a plakk kifejlődésén keresztül a ruptúráig. Számos állatmodell alátámasztja a ROS oki szerepét az ateroszklerózisban, és a humán kutatások is egyre inkább megerősítik az „oxidatív hipotézis” létjogosultságát (66; 71; 73; 89). Szabad oxigéngyökök keletkezhetnek enzimikus úton, különféle oxidáz enzimek, mint például a NOX, a xantinoxidáz, a flavinoxidáz, vagy a lipoxigenáz által katalizált folyamatban, amely során az oxigénből szuperoxid anionok keletkeznek. Megfigyelhető az oxigénből szabadgyök és hidrogénperoxid képződés enzimek nélkül is minden oxigén részvételével zajló folyamatban (90). A szuperoxid anionok redukciós folyamatokon is keresztülmehetnek a NOX és a xantinoxidázok hatására, ill. szubsztrátjává válhatnak a szuperoxid dizmutáznak (SOD), így hidrogénperoxid (H_2O_2) és víz keletkezik. A keletkező hidrogénperoxid egyéb reakciókra is képes, így Fe^{2+} ionnal magas reaktivitású $\cdot HO$ -t képezhet (Fenton reakció) (89).

A szuperoxid anionok károsítják a szöveteket, a membrán és lipoprotein eredetű többszörösen telítetlen zsírsavak oldalláncáról hidrogént vonnak el, így peroxilgyökök keletkeznek, amely újabb reakciót indítva láncreakciót hoz létre. Ezek a reakciók az érfal simaizomsejtek növekedését befolyásolva az aterogenezis első lépéséhez vezethetnek (70). A reaktív oxigén gyökök inaktíválják a NO-t. A NO és a szuperoxid anion reakciójából keletkezik a peroxinitrit, egy erős oxidálószer. Ez a reakció az endotél-

függő, NO meditatla vazodilatáció csökkenését, és az érfal további sérülését okozhatja (91), ahogy erről már korábban volt szó.

Az oxidációs folyamatok túlsúlyához vezethet minden olyan betegség, amely gyulladást indít el a szervezetben, többek között a különböző fertőzések, autoimmun betegségek, a diabétesz mellitus, a hiperkoleszterinémia, stb. (5. ábra)



5. ábra: A reaktív oxigén felszabadulással járó állapotok (92)

Az oxidációs folyamatok túlsúlyához vezethet minden olyan betegség, amely gyulladást indít el a szervezetben, többek között a különböző fertőzések, autoimmun betegségek, a diabétesz mellitus, és a hiperkoleszterinémia.

3.3.1 Hipertónia

Hipertónia egyrészt az emelkedett perctérfogatnak, másrészt a megnövekedett perifériás ellenállásnak köszönhetően alakulhat ki. Mai felfogásunk szerint a hipertónia és az azt követő anyagcsere változások kialakulásában elsődleges szerepe van a szimpatikus aktivitás fokozódásának, amely a miokardium kontraktilitása, és a szívfrekvencia növelésével fokozza a verő- és perctérfogatot, illetve emeli a vérnyomást (93). Az áramlás fokozódásával a nyíróerő megnő, amire az endotél fokozott NO elválasztással reagál, így áramlás-függő vazorelaxációt okoz (55).

A nyíróerő tartóssá válásával az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak kimerülnek, aminek következtében csökken a NO termelés, így az áramlás-függő vazodilatáció csökken (58). A közvetlen, endotél érő mechanikai stressz a ROS felszabadulást is fokozza. Emellett egyes tanulmányok szerint a nyíróerő következtében aktiválódik az ANG II

felszabadulás is, amely a rezisztencia erek vazokonstrikióját váltja ki, és a NADPH rendszer közvetlen stimulációján keresztül tovább fokozza a ROS termelést (94). A megnövekedett oxidatív terhelés csökkenti az endotél relaxációs kapacitását, és növekedési faktorok felszabadulását váltja ki. Ezzel beindulnak a remodelling kezdeti lépései (76).

Az ateroszklerotikus szövődmények szempontjából döntő a nyomásterhelésre adott vaszkuláris válasz, a vaszkuláris remodelling. A simaizmok hipertrófiája és hiperpláziája következtében megvastagodik a média. Az erek lumene szűkül. A kollagén szaporulat miatt az erek compliance csökken, merevebbé válnak, nehezen tágulnak, megnő az ellenállásuk, ami tovább növeli a hipertóniát. (95) A vaszkuláris remodelling csökkent relaxációs kapacitással társul. Ennek hátterében állhat az endotél diszfunkciója, a perivaszkuláris fibrózis, és a kis erek átmérőjének csökkenése (65).

3.3.2 A Policisztás Ovárium Szindróma (PCOS) és vaszkuláris vonatkozásai

A PCOS-ban szenvedő nőknél a sokféle tünet közül a legfontosabb három a krónikus anovuláció, a hiperandrogén állapot és a policisztás ovárium. Mindezekhez gyakran elhízás és inzulinrezisztencia is társul. Az anovuláció vérzési rendellenességek és meddőség formájában okoz panaszt, a hiperandrogenizmus legjellemzőbb eltérése a hirsutizmus és fokozott akné képződés, míg a policisztás ovárium csak ultrahangos vizsgálat során kerül felismerésre.

A korábbi megfigyelések és vizsgálatok alapján a PCOS kialakulásában lényegi faktornak a hiperandrogenizmus tekinthető. A transzsexuálisokban alkalmazott tesztoszteron abdominális elhízást és inzulinrezisztenciát indukál (96). Az elhízás miatt tovább fokozódik a hiperandrogén állapot, amit a hiperinzulinémia tovább ront, így egy ördögi kör alakul ki. A petefészek folliculáris és theka sejtjein is vannak inzulin receptorok. Az inzulin, szinergizmusban az LH-val, fokozza az ovarialis androgén termelést, azonban az ovárium szintjén nincs inzulinrezisztencia. Így a hiperinzulinémia intraovariális hiperandrogenizmushoz is vezet, vagy tovább fokozza azt. Ennek következtében a folliculáris érés leáll, azonban a magas inzulin szint a folliculusok

fejlődését is stimulálja, így a follikuláris ciszták száma és mérete növekszik, de nem alakul ki érett tüsző (25). Mindezek alapján elmondható, hogy a hiperinzulinémia is központi szerepet játszik a PCOS patogenezisében.

A hiperinzulinémiához vezető okok egyike az inzulinrezisztencia, amely hosszútávon fokozza a T2DM kialakulásának rizikóját. A PCOS-ban nem a betegek inzulin affinitása csökken, ellentétben a T2DM-el, hanem az inzulinrezisztencia posztreceptorális szinten alakul ki. A PCOS-ás betegek több mint felében kimutatták az inzulin receptor csökkent tirozin-autofoszforylációját és fokozott szerin-foszforylációját, amelyek a receptor aktivitását csökkentik (97-99).

A PCOS-ban szenvedő nőkben már korai stádiumban gyakoriak a metabolikus eltérések, az endotél diszfunkció, az inzulinrezisztencia és a T2DM (100). Mindezek alapján joggal feltételezhető a kardiovaszkuláris veszélyeztetettség fokozódása, bár a tényleges kockázat megítélését nehezíti a megfelelő epidemiológiai vizsgálatok hiánya. Korábbi vizsgálatok kimutatták fiatal, elhízott PCOS-ás nőkben az inzulin, a szexuál hormon kötő globulin szintek, és a testtömeg index (BMI) egymástól független korrelációját a bal kamra tömegének növekedésével és a magasabb vérnyomással (101). További vizsgálatok érrendszeri diszfunkciót írtak le PCOS-ban, az intima/média vastagság, a koronária kalciumtartalom, az áramlás-függő vazodilatáció és az érfalmerevség mérésével (102; 103). A humán PCOS-ban kimutattak a mikrovaszkuláris diszfunkciót is, ami az ACh-függő vazodilatáció csökkenésében nyilvánult meg. Az ACh-ra adott csökkent válaszreakció feltételezhetően a metabolikus változásokhoz, különösen az inzulinrezisztenciához kapcsolódik (100; 104). A PCOS-szindrómás nők karotisz artéria pulzatis indexe csökkent, és a kardiovaszkuláris rizikó fokozódott (100; 105). Az e mögött álló mechanizmusokat, és a lehetséges terápiás lehetőségeket folyamatosan kutatják.

3.3.2.1 D-vitamin lehetséges szerepe PCOS-ban

A D-vitamin hiány prevalenciája a teljes populációban 41%, amely gyakrabban társul elhízással, magas vérnyomással, magas HDL szinttel, továbbá alacsony tejtermék fogyasztással (106). A magas előfordulás az alacsony D-vitamin tartalmú élelmiszerek fogyasztásával és a napon töltött órák számának csökkenésével magyarázható. Az alacsony D-vitamin-szint felelős az angol-kór kialakulásáért, súlyosbítja az oszteoporózist, és növeli bizonyos rákos betegségekre, hipertóniára és a kardiovaszkuláris betegségekre való hajlamot (107).

A PCOS-ás betegek 72%-ban D-vitamin hiányt találtak (108). A D-vitamin hiány következtében a parathormon-koncentráció általában magasabb. A kalcium fontos szerepet játszik a petesejt érésében, így logikus, hogy a D-vitamin és a kalcium-anyagcsere zavara hozzájárulhat a folliculus fejlődés gátlásához. D-vitamin és egyidejű kalcium kezelés hatására a PCOS-ás betegek egy részénél rendeződnek a menstruációs zavarok (109). Ezen kívül számos tanulmány összefüggésbe hozza a D-vitamin hiányt a különböző metabolikus rizikófaktorok (BMI, éhgyomri glükóz, triglicerid, CRP, inzulin) emelkedett szintjével PCOS-ban (110), míg mások a D-vitamin pótlás hatására ezek javulását írták le (111). A D-vitamin-hiány fontos patogenetikai tényezőnek bizonyult az inzulinrezisztencia kialakulásában is, PCOS-ban (112).

A D-vitamin érvédő hatásáról már számos tanulmány született. Spontán hipertenzív patkány (SHR) törzsben krónikus, 6-hetes D-vitamin-kezelés hatására normalizálódott az ACh-indukálta vazorelaxáció. A kezelés alatt változatlan maradt az intracelluláris kalcium egyensúly, csökkent viszont a ROS termelés, és a COX-1 expresszió (113). Egy patkány aortákon végzett kutatás szerint a D-vitamin fontos szerepet játszik az érreaktivitás, és az érrendszer szexuálhormonok iránti érzékenységének megőrzésében, a kreatin-kináz rendszer aktiválásán keresztül (114). Továbbá, a D-vitamin pótlás a plazma NO válaszkészségét is javíthatja egyidejűleg a glükóz és lipid metabolizmus helyreállításával (115). Összességében a D-vitamin a normális érfunkció és vaszkuláris válaszkészség fenntartását segíti elő, azonban az inzulin-háztartásra gyakorolt esetleges jótékony hatását PCOS-ban még nem sikerült bizonyítani (116).

3.4 A TGF- β család bemutatása

A TGF- β család számos szerkezetileg rokon polipeptid növekedési faktort foglal magába. Eddig több mint 35 tagját azonosították. A család magába foglalja a prototípus TGF- β -t, a nodális és a csont morfogenetikus proteint (Bone morphogenetic protein - BMP), és az aktivint. A család tagjai dimerként fordulnak elő, amelyek lehetnek homo- és heterodimerek is.

A Transzformáló Növekedési Faktorok a sejt szintű folyamatok mindegyikét képesek befolyásolni, a sejtproliferációtól, a sejt differenciáción, a motilitáson és az adhézióon keresztül a sejthalálig. A génexpressziós mintázat specifikus, az adott szövet növekedésétől, homeosztázisától, regenerációs kapacitásától függően, a rágcsálótól az emberig. Végeredményben ezek a faktorok felelősek a sejt sorsát befolyásoló alapvető intercelluláris jelátvitelért. TGF- β és a többi faktor multifunkcionális agonisták, amelyeknek hatása legalább annyira függ a sejt válaszkészségétől, mint maguktól a faktoroktól. (117)

A TGF- β családhoz számos különböző, a sejt növekedését, differenciálódását szabályozó növekedési faktor, ill. egy, az immunrendszert befolyásoló citokin tartozik. A II. táblázatban a TGF- β család jelenleg ismert tagjait és főbb hatásait soroltuk fel.

A TGF- β citokinnek három izoformája ismert emlősökben: TGF- β 1, TGF- β 2 és TGF- β 3, amelyek közül mindegyik kötődhet ugyanahhoz a receptorhoz, és hasonló hatásokat válthat ki. A TGF- β 1 a leginkább tanulmányozott izoforma. Ezeken kívül, több mint 20 hasonló szerkezetű citokin tartozik még a TGF- β alcsaládba, amelyeknek szerteágazó hatásuk van, főként az embrionális fejlődés során. A TGF- β megőrizte szerkezetét (evolucionálisan konzervált molekula), így hasonló emberben, majmokban, szarvasmarhában, sertésben, és rágcsálókban, ami jelzi kiemelt szerepét a sejt-homeosztázisban (118).

A TGF- β -receptorok ligandjait a legkülönbözőbb sejtek termelik, amelyek önmagukra visszahatva szabályozzák az aktív citokinek felszabadulását, amelyek végül kifejtik hatásukat a receptor komplexeken. A legújabb kutatások szerint a T-sejt mind forrása, mind célsejtje lehet a TGF- β -nak az érlelésesedés és egyéb krónikus gyulladás folyamán (119; 120).

II. táblázat: TGF- β szupercsalád tagjai és főbb funkcióik (121)

BMP2 : gasztruláció, neurogenézis, kondrogenezis, interdigitális apoptózis
BMP5 : szövettudifferenciáció, neurogenézis
BMP3 : csontképzés, enkondrális csontképzés, monocita kemotaxis
Vg1 : axiális mezoderma fejlődés
GDF5 : kondrogenezis
Aktivinek : FSH termelés, eritroid sejtudifferenciáció
TGF-β : sejtciklus felfüggesztése epiteliális és hemopoetikus sejtekben, mezenhima-proliferáció kontroll, sebgyógyulás, ECM termelés (fibrózis), immunszupresszió

3.5 TGF- β élettani és kórlettani szerepe

A TGF- β a legrégebben ismert és kutatott profibrotikus citokin. Emellett a másik legtöbbet kutatott szerepe a gyulladáscsökkentő hatása. Így az érlemeszesedés többlépcsős folyamatát is különböző pontokon befolyásolja, más-más mechanizmussal, sokszor ellentmondásosan. Bizonyos kutatások ateroprotektív, mások aterogén tulajdonságait tartják elsődlegesnek. A TGF- β ateroszklerózisban betöltött pontos patogenetikai szerepe még nem ismert.

3.5.1 Gyulladáscsökkentő hatások

Vaszkuláris simaizom sejtenyészetben (VSMC) a TGF- β gátolja a sejtproliferációt és migrációt, és ugyancsak gátolja a leukocita kitapadásához szükséges adhéziós molekulák expresszióját (122). A TGF- β gyulladáscsökkentő hatását, mint a Th3 sejtek által termelt citokin fejt ki in vivo (123). A Th3 egy immunregulátor sejt a perifériás tolerancia fő végrehajtója, amelynek fő citokinje a TGF- β mellett az IL-10. A direkt gyulladáscsökkentő hatásokon kívül a Th3 regulátor sejteknek további endotél aktivációt gátló hatásai vannak. Sejtenyészetben például gátolják a makrofágok „habos sejté” alakulását (124).

3.5.2 Profibrotikus hatások

A TGF- β az egyik legtöbbet vizsgált profibrotikus faktor, amely közvetíti más fibroblaszt-növekedést serkentő faktorok hatását is, pl. ANG II, aldosteron, és noradrenalin (NA) (125; 126). A TGF- β fokozza a fibrotikus folyamatokat transzgenikus egerekben, ami a hepatociták körüli kollagén lerakódást, glomerulonefritist, arteritist, miokarditist, és atrófiás elváltozásokat okoz a hasnyálmirigy és a here területén (9; 127; 128).

A gyulladásos beszűródés sejteinek fontos szerepe lehet a glomeruloszklerózis patomechanizmusában, amelynek során az infiltráló sejtek TGF- β -t termelnek, valamint oxidatív stresszt indukálnak. Emellett maga a TGF- β is oxidatív stresszt indukál (11). A gyulladás hatással van a podocitákra is, amelyek fokozott ANG II és TGF- β termeléssel válaszolnak. Így az emelkedett TGF- β , ANG II szint és az oxidatív stressz együttesen tovább súlyosbítja a gyulladást (129). A károsodott vese afferens idegi úton képes aktiválni a szimpatikus idegrendszert, amely hemodinamikai hatásokon kívül befolyásolja a renin szekréciót és a mezangiális sejtek ECM termelését (130). Az emelkedett ANG II, az aktiválódott szimpatikus idegrendszer és a károsodott vese fontos szerepet játszik a hipertónia kialakulásában is (131).

A TGF- β expresszió emelkedésének kritikus szerepe van humán szívizom fibrotikus elváltozásaiban, szívelégtelenségben, és szív hipertrófiában (132; 133). TGF- β hatására a miokardium fibroblasztjai patológiás miofibroblasztokká alakulnak (134). A miofibroblasztok kontraktilis tulajdonsággal rendelkeznek, azonban simaizom-aktint (SM-aktin) és nagy mennyiségű ECM termelnek. A fibroblasztok TGF- β hatására létrejövő miofibroblaszt transzformációjában a NOX-nak, első sorban a NOX4 által termelt reaktív oxigénradikálok tulajdonítanak központi szerepet (17; 135; 136).

3.5.3 Extracelluláris mátrix szintézis

Simaizomsejt tenyészetben a TGF- β drámaian növeli az ECM és kollagén termelést. Ezt a hatást „TGF- β signaling molecule” (SMAD) proteineken keresztül (SMAD-2, -3), a megfelelő gének serkentésével éri el. A TGF- β fokozza továbbá az integrinek specifikus kötődését a mátrix-fehérjékhez. A TGF- β kemotaktikus hatással bír a fibroblasztokra és monocitákra, így a szövetsérülés helyére vonzza az ECM termelésért felelős sejteket (137; 138).

3.5.4 A szív és érrendszer fejlődésére kifejtett hatások

Embrióban a TGF- β aktív szerepet játszik az epiteliális-mezenhimális transzdifferentiációban (EMT), amely folyamat elengedhetetlen az endocardium normális vaszkularizációjának, és miokardium kialakulása szempontjából (139). Figyelemreméltó, hogy a TGF- β receptorok korai mutációi hibás érfal struktúrához vezetnek (140). Ez is mutatja a TGF- β szerepének fontosságát az érfal felépítésében, és a normális szerkezet fenntartásában. A TGF- β II-es receptor is nélkülözhetetlennek tűnik az érképzés során, hiszen a génátírás blokkolása, a rendes vaszkularizáció elmaradása következtében korai embrionális halálhoz vezet (141).

Felnőtt egyedben a TGF- β -nak a kardiális hipertrófia, vaszkuláris remodelling, és a RAS szabályozásában van szerepe (133). Mindazonáltal a magas affinitású TGF- β receptorokat az elmúlt időszakban összefüggésbe hozták más érbetegségekkel is. Loeys-

Deitz Szindrómában és Ehler-Danlos Szindrómában (klinikailag mindkettő agresszív aorta aneurizma képződéshez, és rendszerint a 30-as évek körül halálhoz vezet) számos pontmutációt találtak az I-es és II-es TGF- β receptorokon (142; 143). A Marfan szindróma kapcsán további mutációkat fedeztek fel ugyanezek a géneken (144). Más, TGF- β -val kapcsolatos citokinek szintén fontos szerepet töltenek be az érfal szerkezetének fenntartásában. A BMP-II-receptorok mutációit összefüggésbe hozták például a pulmonáris hipertóniával. Az activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) I-es típusú receptor funkció kiesése pedig a tüdő fibroblasztok mio-transz-differenciációjával jár (145).

Összességében, ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a TGF- β fontos szerepet játszik az érrendszer egészséges fejlődésében, és a kifejlődött struktúrák fenntartásában.

3.5.5 A TGF- β szerepe az érrelmeszesedésben

A protektív citokin elmélet szerint a TGF- β az ECM szintézisének fokozásával elősegíti a „kollagén-sapka” kialakulását a képződő plakk felszínén (146). A TGF- β továbbá drámai gyulladáscsökkentő jelátvitelt indít. Hiánya perinatális halálhoz vezet, a leukociták különböző szervekbe való infiltrációja miatt, továbbá a leukociták, főleg makrofágok és T sejtek akkumulációja korai ateroszklerotikus léziók kialakulását segíti elő egérben (124). Mindezek alapján a TGF- β kétféle úton játszhat protektív szerepet az érrelmeszesedésben, egyrészt immunszuppresszív tulajdonsága segítségével gátolhatja a T-sejt felhalmozódást a lézió körül, másrészt fibrogenetikus hatásával stabilizálhatja az ateroszklerotikus léziókat.

A TGF- β -nak azonban van egy másik arca. Egyre több kutatás szól arról, hogy tartós TGF- β hatás, a profibrotikus tulajdonságainak köszönhetően és a NOX rendszeren keresztül létrehozott oxigényök terhelés révén az érrendszer és a szívizomzat károsodásához vezethet (16).

A TGF- β emeli a NOX4 szintjét, amelynek hatására szuperoxid termelődik, és emelkedik a SM-aktin, a fibronectin, a kollagén A1, és a kötőszöveti növekedési faktor (CTGF) szintje (147; 148). Végül a TGF- β hatására fokozódó NOX4 expresszió a ROS

szint emelkedéséhez, a SMAD2/3 foszforilációjához és így a NOX4 hosszú távú indukciójához vezet, amely endotél diszfunkciót és tartós profibrotikus és aterogén hatásokat eredményez (17; 149).

3.6 *Állatmodellek*

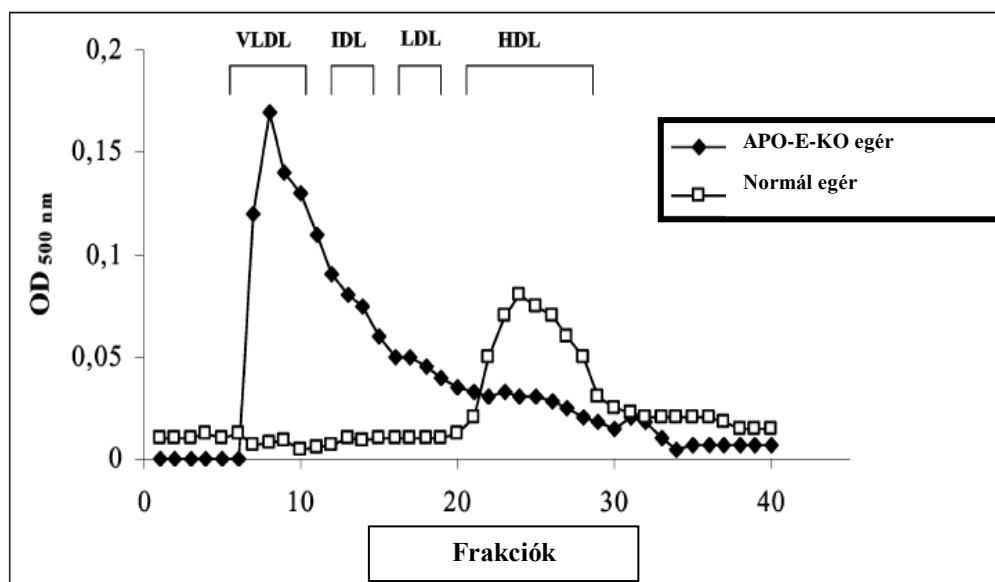
3.6.1 **Az érelmeszesedés APO-E knockout egérmodellje**

A vad típusú egerek meglehetősen ellenállóak az ateroszklerózissal szemben, mert magas a nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) antiateroszklerotikus, és alacsony a proaterogénikus LDL és nagyon kis sűrűségű lipoprotein (VLDL) szintjük. A széles körben használt apolipoprotein E-hiányos egerekben (APO-E-KO egerek) az APO-E gén célzott kiütése súlyos hiperkoleszterinémiához és spontán ateroszklerózis kialakulásához vezet. Az APO-E-KO egeret 1992-ben hozták létre, az APO-E gén inaktiválásával (150).

Az APO-E egy glikoprotein, amelyet a máj, az agy és egyéb szövetek szintetizálnak mind az emberben, mind az egérben. Az APO-E szerkezeti eleme a LDL-nek. Az APO-E segítségével kötődnek a remnant lipoproteinek (kilomikron remnant, VLDL remnant=IDL) az LDL receptorhoz (LDLR, ill. LDL receptor like protein: LRP), és így kerülnek be a hepatocitákba. APO-E hiánya esetén megnövekszik az IDL szint. A hepatocitákat elkerülő IDL LDL-lé alakul, így következményesen jelentősen megemelkedik az LDL szint (151). A rágcsáló APO-E-t kódoló génnel ellentétben a humán APO-E gén polimorf, típusai APO-E-2, APO-E-3, APO-E-4. Ezek közül az APO-E-3 a legáltalánosabb. Az APO-E-2 allélra homozigóta emberek lipoproteinjeinek LDL-receptor (LDLR) és LDL-receptor-related protein (LRP) iránti affinitása jelentősen csökkent (152). Ezekben az emberekben familiáris diszbeta lipoproteinémia (Frederickson 3-as típusú családi hiperlipoproteinémia) alakul ki magas kilomikron és IDL, következményesen magas koleszterin- és triglicerid-szinttel.

Az APO-E-KO egerekben aterogén diszlipidémia alakul ki emelkedett VLDL és csökkent HDL koleszterin szinttel, ellentétben a vad típusal, ahol a HDL koleszterin van túlsúlyban. A 6. ábra az APO-E-KO és a vad típusba tartozó egerek lipoprotein

frakcióiban mért koleszterin-összetételt mutatja kromatográfias módszerrel mérve. Az állatok összkoleszterinje, HDL koleszterinje, és trigliceridszintje a *III. táblázatban* leírtak szerint alakul.



6. ábra: A Normál és az APO-E-KO egerek lipoprotein frakcióiban mért koleszterin koncentrációk (fast protein liquid chromatography = FPLC)

(151) A vad típusú egerek meglehetősen ellenállóak az ateroszklerózissal szemben, mert magas a nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) és alacsony az LDL és VLDL szintjük. Az APO-E-KO egerek az APO-E gén célzott kiütése a VLDL frakció emelkedéséhez, súlyos hiperkoleszterinémiához és spontán ateroszklerózis kialakulásához vezet.

III. táblázat: A normál, heterozigóta és homozigóta APO-E-KO egerek szérum összkoleszterinje, HDL-, és triglicerid-szintjei (151)

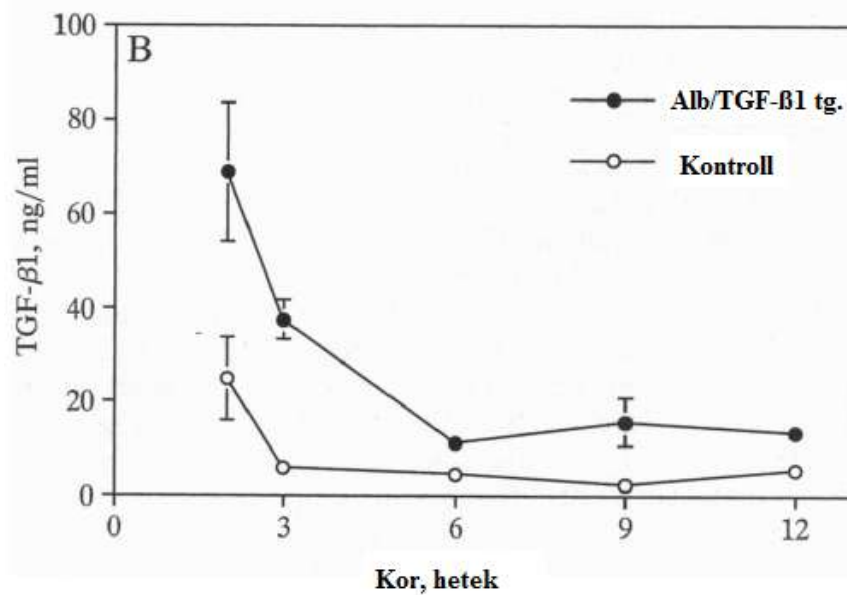
	Összkoleszterin (mg/dl±SD)	HDL (mg/dl ± SD)	TG (mg/dl ± SD)
Normál	86 ± 20	73 ± 28	73 ± 36
Heterozigóta	88 ± 22	75 ± 18	102 ± 40
Homozigóta	434 ± 129	33 ± 15	123 ± 51

Az APO-E-KO egérben már 5-6 hetes korban megjelenik a monocita adhézió az érfalon, illetve elektronmikroszkóppal már látható a transzendoteliális migráció. Már 6-10 hetes korban megjelennek az ateroszklerózis korai szakaszára jellemző „zsíros csík”-ok, „habos sejtekkel” és simaizomsejt migrációval. Ezek az elváltozások gyorsan fejlődnek nekrotikus léziókká, bennük proliferáló simaizomsejtekkel és nagymennyiségű ECM lerakódással. Ugyancsak találunk ezekben a léziókban oxidatív terhelésre utaló jeleket, mind a fiatal elváltozásokban, a makrofágban gazdag területeken, mind előrehaladott stádiumban, a nekrotikus területeken (151).

Az APO-E-KO egértörzsekben kialakuló ateroszklerotikus elváltozások komplexitása, és az egérmodellekben rejlő előnyök együttesen teszik ezt a kísérleti modellt jól használhatóvá: az érlemezésedésben szerepet játszó gének azonosítására; a környezeti tényezők vizsgálatára; különböző sejtek szerepének vizsgálatára az érlemezésedésben; illetve egy adott terápia értékelésére, azaz annak eldöntésére, hogy megállt-e a progresszió, vagy tovább progrediált-e az elváltozás.

3.6.2 A TGF- β transzgenikus egerek

A TGF- β emelkedett szintje számos betegségben megfigyelhető, különösen azokban, amelyekre markáns fibrotikus vagy gyulladásoz léziók jellemzőek. A TGF- β expresszió in vivo hatásának vizsgálatához létrehoztak egy transzgenikus egértörzset. A TGF- β transzgén (TGF- β -TG) egerek hepatocitáiban albumin promóterhez kapcsolt sertés TGF- β 1 transzgén expresszálódik, amelynek jelölése: Alb/TGF- β 1. A heterológ rekombináció az Y kromoszómán történt véletlenszerűen, ennek következtében a transzgént csak a hím állatok hordozzák. A kontroll (C57BL/6) törzsben csak 5 ng/ml volt a TGF- β 1 koncentrációja, míg a transzgenikus törzs 2 hetes egyedeiben 40 ng/ml. A korai magas TGF- β expresszió a születés után gyorsan csökken, a 6. hétre már csak a kontroll érték kétszerese, de ez a különbség továbbra is fennáll az állat élete során. A felnőtt egyedekben is a kontroll érték kétszerese mérhető az irodalmi adatok és a saját ELISA vizsgálataink szerint is (9). (7. ábra)



7. ábra: TGF-β1 plazma koncentráció a kontroll és a transzgenikus törzsekben (ELISA) (9) A TGF-β1 koncentrációja, a transzgenikus törzs (Alb/TGF-β1) 2 hetes egyedeiben 40 ng/ml, míg a kontroll (C57BL/6) törzsben csak 5 ng/ml. A korai magas TGF-β expresszió gyorsan csökken, a 6. hétre már csak a kontroll érték kétszerese, de ez a különbség továbbra is fennáll az állat élete során.

A TGF-β emelkedett szintje a fibrotikus folyamatok felgyorsulását eredményezi a transzgenikus egerekben (127). A TGF-β-TG egerekre proteinuria, azotémia és korai elhullás jellemző. A kialakuló glomeruloszklerózist tubulointersticiális fibrózis követi. Ezeknek az állatoknak a veséjében az extracelluláris mátrix proteinek és a mátrix metalloproteináz-2 fokozott expresszióját figyelték meg (127). A modell nagy előnye az állandó, és fiziológiástól nem irreális mértékben eltérő TGF-β szint. Hátránya azonban, hogy csak a hímek vizsgálhatók.

3.6.3 A PCOS patkánymodellje

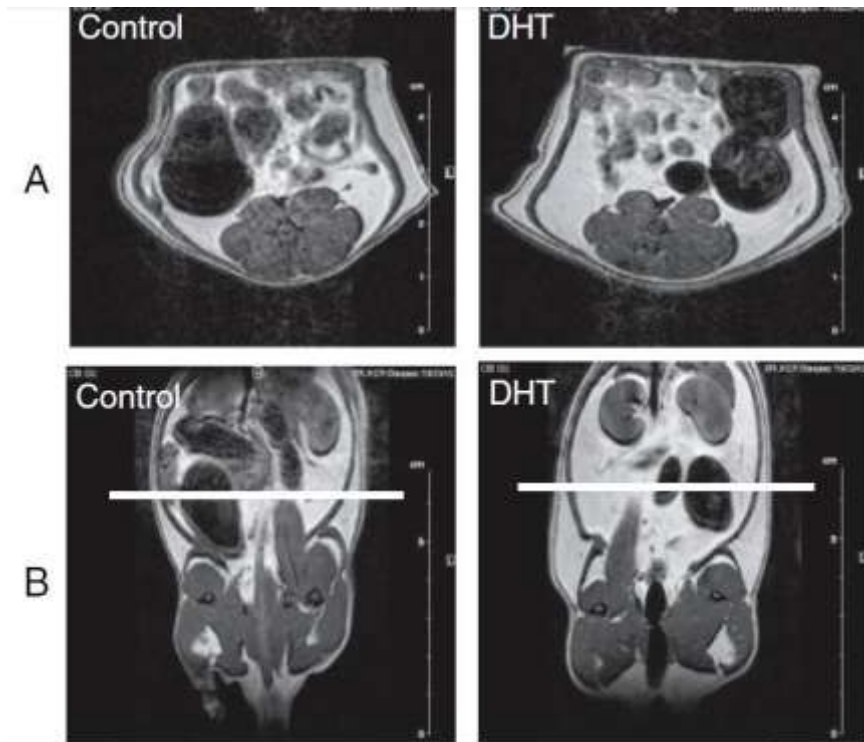
A PCOS patkány modelljét először Manneras karakterizálta 2007-ben (153). 21 napos Wistar nőstényeket kezelt dihidrotesztoszteronnal (DHT), egy bőr alá ültetett, folyamatos hormon-kibocsájtást (83 μ g/nap) biztosító pellet segítségével. A dózist a hiperandrogén PCOS-ás nők plazmaszintjeinek megfelelően állították be, amelyek kb. 1,7-szeres emelkedést mutattak a normál női populációval szemben (154).

A hatvan napos kezelést követően a DHT-nal kezelt nőstények testsúlya jelentősen emelkedett a kontrollhoz képest (320g - DHT vs. 250g - kontroll). A testsúlynövekedés a kezelt állatokban elsősorban az inguinalis, parametriális, és retroperitoneális zsírszövet gyarapodásának, továbbá a mezenteriális adipociták megnagyobbodásának volt köszönhető (8. *ábra*).

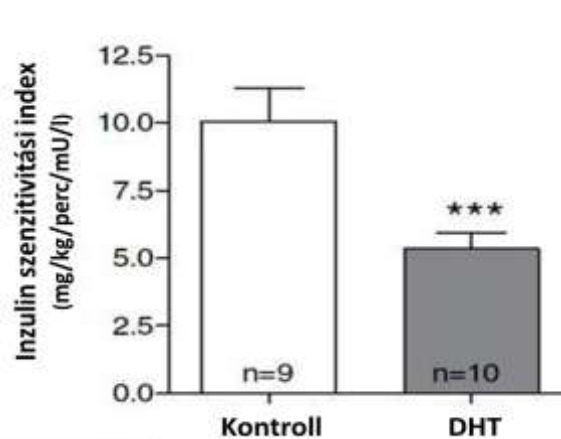
A kezelt patkányokban rendszertelen nemi ciklust, és az ováriumban megnagyobbodott follikulusokat találtak. Az inzulin érzékenységi index felére csökkent DHT-kezelés hatására, ami inzulinrezisztencia kialakulására utal (9. *ábra*). A plazma inzulin-szint szintén magasabb volt a kezelt állatokban (193 \pm 9 mU/liter - kontroll, 270 \pm 15 mU/liter - DHT) (153). Az inzulinrezisztencia, a humán PCOS-ban is jellemző anyagcsere változás (97).

Egy másik tanulmányban ugyanazzal a módszerrel kezelt Sprague-Dawley patkányokban vesekárosodást, emelkedett fehérje ürítést és magas vérnyomást is találtak tartós DHT-kezelés után. Továbbá a kezelt állatok veséjében megemelkedtek a következő oxidatív stressz markerek: Phox 47, 22, 91 és a NOX4 expresszió (155).

Ezek a tanulmányok azt mutatják, hogy a DHT-nal indukált PCOS-ás patkányok produkálják a humán PCOS ovarialis és metabolikus tüneteit is, ezért megfelelő modellként szolgálnak a betegség patomechanizmusának további vizsgálatához.



8. ábra: A zsírszövet eloszlásra a DHT-nal kezelt patkányban MRI felvételeken A keresztmetszeti felvételek (A) a hosszirányban készült felvételeken (B) jelzett magasságban készültek. A DHT-kezelés hatására jól látható a zsigeri zsírszövet felszaporodása. (153)



9. ábra: Inzulín érzékenységi index DHT-nal kezelt patkányokban (153)
 A inzulín érzékenységi index felére csökkent DHT-kezelés hatására.
 Az értékek a csoport átlagot mutatják, *** = $p < 0,001$ vs. kontroll

4 Célkitűzések

Jelen tanulmány két olyan kutatást foglal össze, amelyek során az endotél diszfunkció hátterében álló mechanizmusokat vizsgáltuk két különböző állatmodellben. Kísérleteink során rágcsáló modelleket alkalmaztunk: az érlemeszesedés génmódosított egérmodelljét és a PCOS patkánymodelljét.

Munkánk első felében a TGF- β endotél károsító hatásait és annak hosszú távú következményeit vizsgáltuk TGF- β transzgenikus és APO-E-KO egereken. A TGF- β hatását az endotélfunkcióra az intézetünkben keresztezett APO-E-KO és TGF- β -TG genotípussal rendelkező (TGF- β -TGxAPO-E-KO) egéren vizsgáltuk, amelynek háttértörzse a C57BL/6 egértörzs volt. Az egyszeresen génmódosított kontroll törzsek: az APO-E-KO törzs, és a magas szérum TGF- β szinttel rendelkező TGF- β -TG törzsek voltak, mindkettő C57BL/6 háttéren. A közös genetikai háttér tette lehetővé a két törzs keresztezését. Vizsgálataink során a keresztezett egértörzset hasonlítottuk a kiindulási törzsekhez. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- **Hogyan befolyásolja az endotél funkciót az emelkedett TGF- β szint izolált aortán?**

A keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) egerekből izolált aorta endotél működését vizsgáltuk, vazokonstriktor prosztaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) ill. vazorelaxáns karbakol (CBH) jelenlétében, miográf segítségével. Hipotézisünk szerint a TGF- β a NOX rendszer aktiválása révén rontja az erek relaxációs képességét.

- **Kivédhető-e a TGF- β endotél funkcióra gyakorolt hatása a NOX rendszer gátló szerével (apocynin), illetve SOD-zal (superoxid lebontó enzim)?**

Apocynin, ill. SOD inkubációt követően újra vizsgáltuk az erek relaxációs készségét. Feltételeztük, hogy ha a TGF- β a NOX rendszer és a ROS felszabadulás serkentésével hat az endotél funkcióra, akkor a gátlószerek kivédik ezt a hatást.

- **Emelkedik-e a ROS termelés TGF- β hatására az aorta endotél rétegében?**

Dihidroetidin festést követően konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk az izolált aorta endotél rétegét. Hipotézisünk szerint a keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) törzsből származó erekben a fokozott NOX aktivitásnak köszönhetően az oxigén szabadgyökök termelődésének emelkedése mutatható ki.

- **Az emelkedett TGF- β szint hosszútávon növeli-e az ateroszklerotikus plakkok területét az aorta belső felszínén?**

Idősebb állatokból izolált aortán zsírfestést végeztünk, az aorta belső felületén lévő plakkok területének quantifikálása céljából (en face staining). Hipotézisünk szerint a keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) törzsekben az érlelmeszesedés felgyorsulása miatt az ateroszklerotikus plakkok területe nagyobb.

- **Befolyásolja-e hosszútávon a vérnyomást a TGF- β emelkedett szintje?**

Idősebb állatokban in vivo vérnyomást mértünk karotisz kanülön keresztül, altatásban. Hipotézisünk szerint, a keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) törzsből az endotél diszfunkció hosszú távú következménye a hipertónia.

- **Befolyásolja-e hosszútávon a szív és az aorta morfológiáját a TGF- β emelkedett szintje?**

Idősebb állatokból szív és aorta szövettani metszeteket készítettünk, és ezeket morfológiai módszerekkel értékeltük. Azt vártuk, hogy a keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) törzsből hosszútávon az aortafal, ill. a szívizom szövetben átépülés, szerkezeti változás jön létre.

Munkánk második felében a DHT-nal indukált PCOS patkány modelljében vizsgáltuk a PCOS kezdeti szakaszában fennálló szisztémás és ér-szintű inzulinrezisztenciát, és a D-vitamin-kezelés hatását. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- **Már korai stádiumban kialakulnak-e a DHT-nal indukált PCOS-ban a betegségre jellemző metabolikus eltérések? Milyen hatással van erre a D-vitamin?**

Krónikus DHT-kezelés hatására modellünkben a szénhidrát anyagcsere felborulása várható (153). Feltételeztük, hogy a DHT-nal kezelt patkányokban szisztémás inzulinrezisztencia alakul ki. Hipotézisünk szerint az párhuzamos D-vitamin-kezelés jótékony hatást gyakorol a kialakuló inzulinrezisztenciára.

- **Csökken-e az endotél inzulin-ra, mint relaxánsra adott válasza DHT-indukálta PCOS-ban?**

Az inzulin, irodalmi adatok alapján, enyhe vazorelaxáns. Feltételeztük, hogy DHT-nal kezelt patkányokban ér-szintű inzulinrezisztencia alakul ki, vagyis az inzulinra adott relaxációs válaszok csökkennek.

- **Befolyásolja-e a D-vitamin-kezelés a DHT-indukálta PCOS-ban az aorta inzulin-függő relaxációját?**

A DHT-nal kezelt patkányok egy csoportját párhuzamosan D-vitaminnal is kezeltük. Feltételeztük, hogy a D-vitamin-kezelés a DHT-kezelés hatására várható ér-szintű inzulinrezisztenciát kivédi.

- **Milyen jelátviteli útvonalak játszanak szerepet az aorta inzulin-függő relaxációjában? Hogyan befolyásolja ezeket a D-vitamin-kezelés?**

Az inzulin-relaxációt ismert hatású gátló-szerek jelenlétében vizsgáltuk. A NO szintáz gátlásával a NO-függő dilatáció szerepét, a prosztanoidok gátlásával a prosztanoid-függő kontrakció érintettségét vizsgáltuk. Feltételeztük, hogy a csökkent inzulin-relaxáció döntően a NO-függő dilatáció sérülésén keresztül jön létre.

5 Módszerek

5.1 A kísérletek során használt egerek

5.1.1 APO-E knockout egerek (APO-E-KO)

Az APO-E-KO egérben aterogén diszlipidémia, és ennek következtében ateroszklerotikus léziók jönnek létre, így az érlelmeszesedés modellezésére jól használható (lásd Génmódosított törzsek c. fejezet). A Jackson Laboratories-tól vásárolt APO-E-KO (vad típus: C57BL/6) tenyészállatokat a Kórélettani Intézet „specified pathogen free” (SPF) állatházában tenyésztettük. (engedély száma: 1831/001/2004)

5.1.2 A TGF- β transzgenikus egerek (TGF- β -TG)

A TGF- β -TG egerek (törzstenyészet a SE Kórélettani Intézetben) jellemzője a TGF- β fokozott expressziója a májban. (lásd Génmódosított törzsek c. fejezet) Az albumin promóterhez kapcsolt TGF- β transzgén hatására a vérben keringő TGF- β szintje magasabb, mint a vad típusban. A TGF- β -TG egerek C57BL/6 háttérre történő visszakeresztezése intézetünkben történt (NIH/NIDDK S. Thorgerisson engedélyével Dr. Gerő Domokos és Dr. Mózes Miklós végezte).

5.1.3 Keresztezett, TGF- β -TGxAPO-E-KO törzs

A keresztezést a Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézetében végeztük. A keresztezett, TGF- β -TGxAPO-E-KO egerek magas TGF- β szinttel és ateroszklerotikus elváltozásokkal rendelkeznek. Az erek működésének vizsgálatával a magas plazma TGF- β szintnek az érlelmeszesedés folyamatában, ill. a vérnyomás szabályozásában betöltött szerepét ezeken az állatokon vizsgáltuk.

5.1.4 Kontroll (C57BL/6)

A „C57 black 6” egértörzs egy gyakran használt beltenyésztett törzs a laboratóriumokban. Az általunk vizsgált TGF- β -TG, APO-E-KO és TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsek esetében is C57BL/6 törzs volt a háttértörzs. Kísérleteink során a háttértörzs volt a kontroll.

5.2 TGF- β és TGF- β receptor immunhisztokémia egér aortában és TGF- β szint meghatározás ELISA-val

Immunfestéssel vizsgáltuk a szövetekben található TGF- β és TGF- β receptorok szintjét. Erre azért volt szükség, hogy meggyőződjünk róla, hogy a magas szérumban TGF- β koncentráció okoz-e szöveti TGF- β és TGF- β receptor (TGF- β -RI) expresszió downregulációt.

Az immunfestéshez a szív és az aorta paraffinba ágyazott metszeteit használtuk. A metszeteket deparaffinizáltuk (xilol 3x5 perc) és rehidratáltuk (100-96-70% alkohol), 0,17%-os tripszinnel inkubáltunk 20 percig, 37 °C fokon. A festést anti-humán TGF- β 1 és TGF- β -RI primer antitesttel végeztük (Sigma-Aldrich), ami keresztreakciót ad az egér TGF- β 1 és TGF- β -RI antigénnel, majd szekunder és terciér antitesteket használtunk. Az antitesttel festődött szövetrészleteket Fast Reddel tettük láthatóvá, a sejtmagokat pedig hematoxilinnal festettük.

A metszeteket szemikvantitatív módon értékeltük. A festődés intenzitását pontszámokkal értékeltük, 0-tól 3-ig terjedő skálán. Pontozás: 0 - nincs festődés; 1 - halvány, inkomplett festődés a sejtek több mint 10%-ában; 2 - mérsékelt, közepes festődés a sejtek több mint 10%-ában; 3 - erős, komplett festődés a sejtek több mint 10%-ában (156). Minden értékelést vakon végeztünk.

Szemzughból nyert vérmintákat gyűjtöttünk (100 μ l/állat) szilikonozott csövekbe, amelyekben 1mg/ml EDTA-val gátoltuk a véralvadást. A plazma TGF- β szinteket Quantikine TGF- β ELISA-Kit (R&D Systems, Quantikine Minneapolis, USA - Katalógusszám: MB100B) segítségével, a gyártó leírásának megfelelően mértük meg.

5.3 Szuperoxid kimutatás

5.3.1 Dihidroetidin festés

A dihidroetidin (DHE) egy oxidatív fluoreszcens festék, amely a szuperoxid anionok in situ kimutatására alkalmas. A kísérleti állatokat a funkcionális mérésnél leírtak szerint előkészítettük, és 10 ml heparinizált Krebs oldattal transzkardiális perfúziót követően, minden csoportból több torakális aorta szegmentet preparáltunk ki. Az ereket 37 °C fokos Krebs oldatban 10 μ M DHE-nel 20 percig inkubáltuk. Ezt követően az aorta gyűrűket 5 percig festettük Hoechst magfestékkel, a sejtmagok kiemelése céljából. Az ereket felnyitottuk, az endoteliális oldalukkal lefelé tárgylemezre helyeztük, és konfokális mikroszkóppal detektáltuk a szuperoxid anionok jelenlétét (157).

5.3.2 Konfokális mikroszkóp

A konfokális mikroszkóp egy olyan képalkotó eszköz, amelynek segítségével nagy felbontásban tehetünk láthatóvá 3 dimenziós struktúrákat. Ezt az eljárást Marvin Minsky dolgozta ki 1953-ban, de használata csak az 1980-as években, a lézertechnikák kifejlesztésével vált rutinszerűvé (158).

A konfokális mikroszkóp nagy előnye, hogy használatával nagy vastagságú metszetek mély rétegei is értékelhetők. A kibocsátott lézerfény a fluoreszcensen festődött minta egy pontjáról verődik vissza. A különböző struktúrákról, pontról pontra készült felvételeket számítógép értékeli és teszi láthatóvá, a hagyományos mikroszkópnál használt okulárral szemben. A komputeres feldolgozásnak köszönhetően rétegfelvételeket is készíthetünk, így a szövet bármely rétegét külön felvételen vizsgálhatjuk. (159)

5.4 Egérből izolált aortagyűrű funkcionális vizsgálata miográffal

A NO-függő vazodilatációt torakális aorta gyűrűkön vizsgáltuk, mert ezen az érszakaszon a legkönnyebb az endotél mechanikai sérülésének elkerülése. A preparáció során az endotél esetleges biológiai károsodásának elkerülésére gondosan ügyeltünk.

Az állatok 20 perccel az altatás előtt 100 IU/állat heparint kaptak intraperitoneálisan (ip). A torakális aorta ugyanis rugalmassága révén nem esik össze a vérnyomás leesésének pillanatában. Az érlumenben relatíve nagy mennyiségű vérelemzke és granulocita reked meg, és azonnal aktiválódik a keringés leállás, illetve a hipoxia hatására. A felszabaduló anyagok az endotél károsodását okozva, szignifikáns mértékben rontják az ex vivo érreaktivitást (160).

A torakális aorta eltávolítását megelőzően az állatokat éter anesztézia alatt, a jobb karma megnyitásával gyorsan kivéztettük. Ezt követően, a fent részletezett endotél károsodást továbbra is kerülendő, a szíven keresztül 10 ml heparinizált Krebs oldattal perfundáltunk. A perfúzió befejeztével, operációs mikroszkóp alatt kipreparáltuk a teljes torakális szakaszt, és megtisztítva a zsírszövetből, 3mm hosszú gyűrűket izoláltunk. Az aortagyűrűket szervfürdőbe helyeztük. A szervfürdők 8 ml karbogénnel folyamatosan átbuborékolatott 37 fokos Krebs oldattal voltak feltöltve (összetétel (mM): 119 NaCl, 4.7 KCL, 2.5 CaCl₂-2H₂O, 1.17 MgSO₄-7H₂O, 20 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, 0.027 EDTA, 11 glükóz).

A torakális aorta disztális szakaszát egy korábbi tanulmányra alapozva választottuk, amelyben leírták, hogy a CBH-ra adott relaxációs válaszok szignifikánsan nagyobbak voltak a disztális, mint a proximális aorta szakaszon (160). Az endotél épségére különös figyelmet fordítva az aorta gyűrűket rozsdamentes acéltűkre húztuk. Az ereket 30 percig inkubáltuk, ezalatt a szervfürdőt 37 °C-on tartottuk, és fokozatosan (irodalmi adatok alapján) 15 mN előfeszítést hoztunk létre.

A torakális szegmentek izometriás feszülését regisztráltuk (610-M Multi Myograph System; Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) és szoftveresen (AcqKnowledge 3.7.3 software, BIOPAC Systems, Goleta, CA.) értékeltük. A relaxációt a prekontrakció százalékában értékeltük, és az így kapott értékeket átlagoltuk.

A szegmenteken 124 mmol/l káliumos Krebs oldattal referencia kontrakciót hoztunk létre. 30 perccel később 10 μ M PGF_{2 α} -val hoztunk létre stabil és tartós kontrakciót. A kontrakció stabil "plató" fázisában vazodilatátorként CBH-t adtunk, 10⁻⁸-tól 10⁻⁵ μ M-ig, 1,5 percenként, emelkedő dózisokban. Minden egyes prekontrakciós és az azt követő relaxációs válaszok regisztrálása után alaposan átmostuk az ereket Krebs oldattal, és 20 perc regenerációs időt hagytunk. A kísérleti protokollnak megfelelő gátlószerekkel való inkubálást követően megismételtük az előbbi lépéseket (160).

Az első prekontrakciót követően egyszerűen a CBH-ra adott relaxációs válaszokat hasonlítottuk össze az egyes csoportok között. A második prekontrakciót megelőzően az ereket gátlószerekkel inkubáltunk, majd újabb prekontrakciót és relaxációt hoztunk létre, és a relaxációs válaszok változását hasonlítottuk össze a csoportok között. Kísérleteink során 2 protokollt használtunk:

Az I. protokoll szerint a két prekontrakció között az ereket 100 μ M apocyninnel inkubáltunk 20 percig. Az apocynin a NOX rendszer szelektív gátlószere.

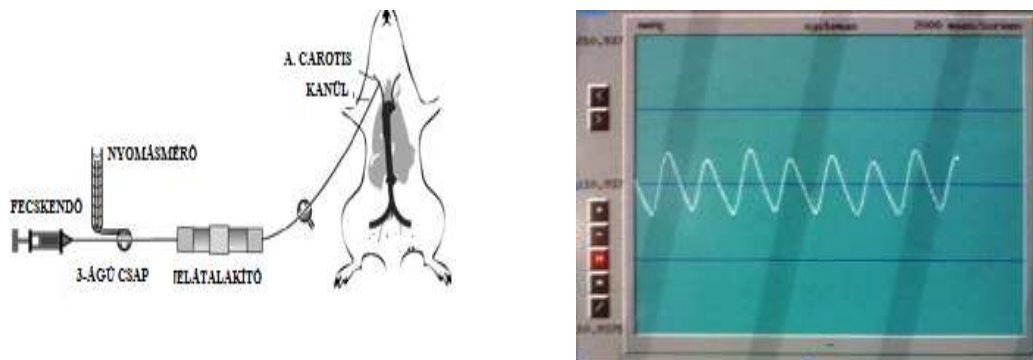
A II. protokoll szerint az inkubációt 200 U/mL SOD-al, a legismertebb szuperoxid aniont elbontó enzimmal végeztük szintén 20 percig.

Így két ponton próbáltuk igazolni a hipotézisünket, amely szerint a TGF- β -val indukált oxidatív stressz endotél diszfunkciót okoz. Egyrészt a TGF- β által stimulált NOX rendszer gátlásával, másrészt az NADPH oxidázok révén felszabaduló szuperoxid anion gyökök mennyiségének csökkentésével.

5.5 Vérnyomásmérés *in vivo* egerekben

Az állatok vérnyomását invazív módszerrel, altatásban, az artéria karotisz kipreparálásával, illetve annak kanülálásával mértük meg. A mérésekhez a fent említett négy genotíusból származó 8 hónapos hím egereket használtunk. Az egereket ip. injektált Ketamin-Xilazin keverékkel altattuk (Ketamin 150 mg/kg + Xilazin 15 mg/kg). A módszer előnye, hogy közvetlenül az artériás rendszerben mérhető a vérnyomás. Hátránya hogy az állatok vérnyomását altatásban mérjük, így az anesztézia befolyásolhatja a vérnyomást, illetve a szívfrekvenciát (161). A méréshez használt kanült, ill. a transzducert heparinózott fizioiógias sóoldattal töltöttük fel, hogy

elkerüljük a kanülbe kerülő vér bealvadását. A vérnyomás mérésére és regisztrálására CARDIOSYS CO-104 (Experimetria Kft, Budapest) típusú berendezést és a hozzá tartozó programot használtuk. A regisztrátumról mind a diasztolés, mind a szisztolés érték leolvasható volt. (10. ábra) A regisztrációt állatonként 30 percen keresztül végeztük, és többszöri leolvasás után átlagoltuk az értékeket.



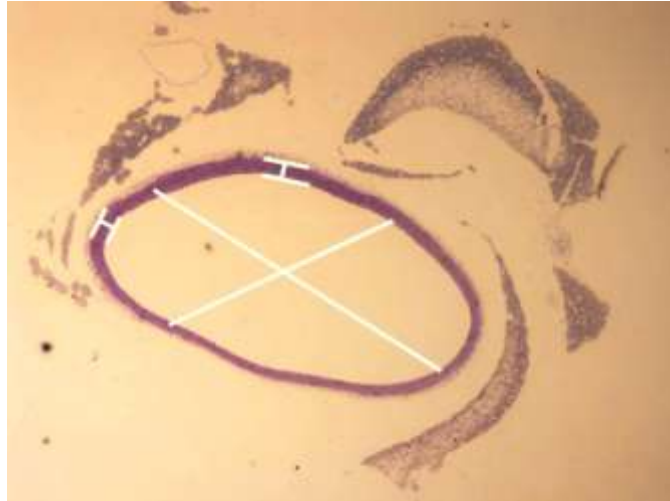
10. ábra: A vérnyomás mérése in vivo

Karotiszba helyezett kanülre csatlakoztatott nyomásmérő berendezés (bal oldalon), és az így kapott nyomásgörbe a monitoron (jobb oldalon)

5.6 Morfológiai vizsgálatok egereken

5.6.1 Aorta morfometria

Az aortafal megvastagodásának mértékét kísérleti állatainkon az aorta fal/lumen arány mérésével kívántuk kimutatni. Az állatok torakális aortáiból készült metszetek digitális felvételein Scion Image (Scion Corporation / NIH / Bethesda ML, USA) szoftver segítségével mértük le a falvastagságot és a lumen átmérőt. (11. ábra) Az így kapott értékeket egymással elosztva kaptuk a fal/lumen arányt, amelyet %-ban fejeztünk ki, és az egyes csoportok között hasonlítottunk össze.



11. ábra: Az aorta/lumen arány mérése szoftverrel (Scion Image)

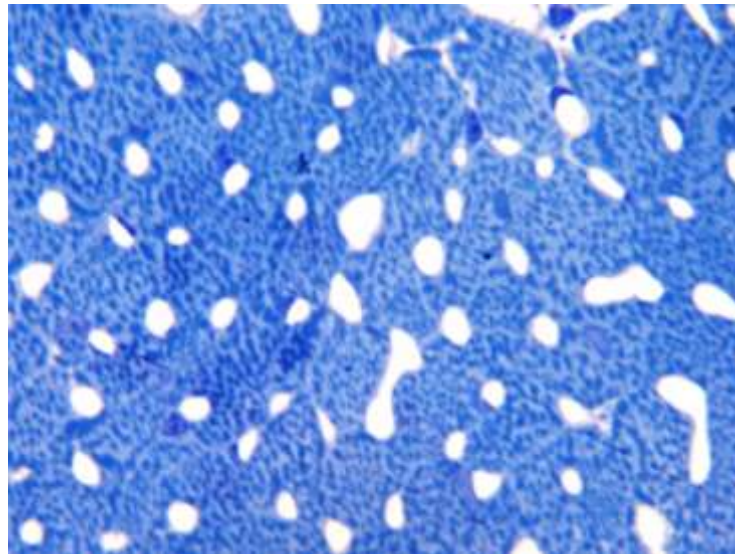
Az aorta keresztmetszetében készült szövettani metszeteken fal és lumen átmérőjét mértünk és a fal/lumen arányt %-ban értékeltük.

5.6.2 Szív morfológia; sztereológia, orientátor metódus

A sztereológia több módszer gyűjtőneve, amelyet a biológusok és a matematikusok közösen dolgoztak ki, annak érdekében, hogy 2 dimenziós metszetek vizsgálatával 3 dimenziós információk birtokába jussanak számítógépes eljárások segítségével. (Haug, Weibel 1987). A sztereológia alapítói rájöttek, hogy a 2 dimenziós metszeteken látható képletek kapcsolatba hozhatók a 3 dimenziós képletekkel, olyan egyszerű matematikai számítás segítségével, amelyek magas szintű matematikai tudás nélkül is könnyen alkalmazható (162).

Az orientátor metódus a sztereológia biológiai szövetekre alkalmazott válfaja. Azon szövetek morfológiai vizsgálatában alkalmazzák, amelyek nem homogén felépítéssel rendelkeznek, így a 2 dimenziós metszetekből nem kaphatók a szövet egésze szempontjából értékelhető információk. Ilyen szövetek például a szív és a vese. A randomizált és egységes mintavétel a statisztikai értékelés szempontjából nagyon fontos. Ez azt jelenti, hogy a mintavétel előtt a szövet minden egyes részletének ugyanolyan eséllyel kell metszetbe kerülnie.

Az egérszív esetében ez 8 különbözően orientált véletlenszerű minta kimetszését jelenti. Ez úgy zajlott, hogy a 4%-os formalinban konzervált, és lecsupaszított egérszíveket lemértük a pitvarok és jobb kamra nélkül. A bal kamra falát félbe vágva szív felenként 3-4 szeletet vágunk. Ezekből kiválasztottunk két olyan szeletet, amelyek nem voltak egymással szomszédságban. A kiválasztott szeleteken hosszanti metszéseket ejtve megpróbáltunk az egyenlő oldalú négyszögekből álló kocka geometriáját leginkább megközelítő mintákat nyerni. Ezek közül szeletenként 2 olyat választottunk, amelyeknek szintén nem volt közös oldaluk. Így szívenként 8 darab, 6 oldalú, közel egyforma felszínekkal rendelkező mintát kaptunk, amelyek a kamraizomzat véletlenszerűen kiválasztott területeiről származó, 2 dimenziós keresztmetszeteit tartalmazták. Beágyazást követően, a minták egyik oldalából félvékony metszet készült mikrotommal. A metszeteket toluidinkékkel festettük, és tárgylemezen rögzítettük. (12. ábra)



12. ábra: Félvékony toluidin-kékkel festet metszet egér miokardiumból
Kontroll törzsből származó, jól kapillarizált miokardium szövetrészlet.

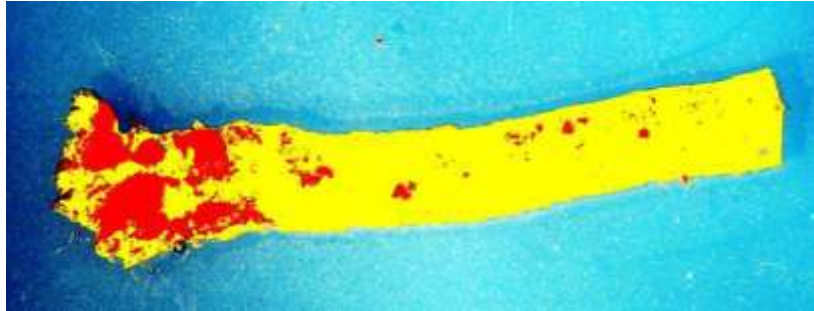
Minden vizsgálatot vakon végeztünk. Fénymikroszkóp alatt egy 100 pontból álló hálót vetítettünk az egyes látóterekre. Látóterenként megszámláltuk a háló területére eső kapilláris keresztmetszetek számát, és a háló rácspontjaira eső kapillárisok, miociták, fibrocyták, pericyták és intersticialis sejtek számát. Metszetenként 8 látóterben, és állatonként 8 metszetben végeztünk számolást, így jutottunk elegendő adathoz a

statisztikai számítások elvégzéséhez. A megadott képletek segítségével számoltunk kapilláris hosszúsúséget, fibrocita súsúséget, intersticiális sejtsúsúséget, és miocita súsúséget.

A kapilláris hosszúsúség (length density = LV) a kapillárisok egységnyi szövet volumenre vonatkoztatott hosszúságát fejezi ki, amely jól jellemzi az adott szívizom kapillarizáltságát. Ezt a következöképpen határoztuk meg: $LV = 2 QA$, ahol a QA az egységnyi felszínre eső kapilláris keresztmetszetek számát jelöli. A teljes szívre vonatkoztatott kapilláris hosszúsúséget a balkamra volumen használatával, a $L = LV \times V$ képlettel számoltuk. Az egyes sejtek súsúsége (volume density = VV) az egységnyi szövetre vonatkoztatott sejtvolument jelzi. Ezt a $PP = VV$ képletből számoltuk, ahol a PP az adott sejt pontdenzitását jelenti. A referencia volumen a kapillárisokon, ereken, fibrocitákon és intersticiális sejteken kívül eső teljes miokardium térfogata volt (163).

5.7 Zsírfestés egér aortában

Az ateroszklerotikus plakkok területének quantifikálására Oil Red O festést alkalmaztunk, egy korábbi közlemény alapján (164). A frissen preparált torakális aortát hosszában felnyitottuk (en face preparátum), hogy teljes belső felszíne szabaddá váljon. Az ily módon preparált ereket desztillált vízzel és 100%-os propilén glikol oldattal lemostuk, majd 1%-os Oil Red O-val (Sigma, Magyarország) 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően az aortákat 85%-os, majd 50%-os propilén glikollal, végül desztillált vízzel lemostuk. A festett és átmosott ereket tárgylemezen rögzítettük vizes médiummal (Aquatex, Merck) és újabb tárgylemezzel lefedtük. A megfestetődött plakkok területét mikroszkóppal és szoftveres morfometriával, a plakk/teljes terület hányadosában határoztuk meg (ImagePro Plus, Media Cybernetics, USA). (13. ábra)



13. ábra: Az Oil Red O festés egér aortán

„En face” preparátum: hosszanti irányban felnyitott aorta belső felszínével felfelé tárgylemezen rögzítve. Szoftver segítségével elkülönítettük a megfestődött plakkok területét (pirossal) a nem festődött területektől (sárga)

5.8 Patkányok

A PCOS modellben összesen 30 db, ivarérett (21-28 napos), 100-140 g súlyú, nőstény Wistar patkányt használtunk (Simmelweis Egyetem, Charles River Ltd.). Az állatok a szokásos patkány tápot, és csapvizet kaptak ad libitum.

5.8.1 DHT-nal kezelt patkányok (DHT)

Nőstény patkányokban PCOS-t indukáltunk, a korábban közölt protokoll szerint (153). 20 állatnak 7,5 mg DHT-t kibocsájtó pelletet ültettünk a hát bőre alá, altatásban (Nembutal 45 mg/tsg ip.). A pelletekből a gyártó által garantált 83µg/nap DHT szabadult fel 70 napig folyamatosan.

5.8.2 DHT-nal és D-vitaminnal kezelt patkányok (DHT+D)

A DHT-nal kezelt 20 állat közül 10 db, 1,25(OH)₂D₃-vitamin-kezelést is kapott, heti 120ng/100tsg dózisban. A kontroll csoport és a másik 10 DHT patkány a beadott D-vitamin oltóanyag térfogatának megfelelő fiziológiás sóoldatot kapott.

5.8.3 Kontroll (álműtött) patkányok

A további 10 állat a DHT pellet beültetés álműtétjén esett át, ill. a beadott D-vitamin oltóanyag térfogatának megfelelő fiziológiás sóoldatot kapott. Ez volt a kontroll csoport. Sebészeti, illetve gyógyszer adagolási probléma nem volt.

5.9 Orális Glukóz Tolerancia Teszt, inzulin, fruktózamin szint meghatározás és testsúlymérés patkányokban

A 8 hetes DHT-kezelést követően orális glukóz tolerancia tesztet (OGTT) végeztünk az állatoknál. Rövid éter narkózisban a farok vénából vettünk vért. A glukóz szinteket Decent Personal Akucheck vércukor mérő készülékkel, és a hozzá tartozó Akucheck tesztesíkkal mértük meg (77 Electronics Ltd., Budapest, Hungary). Az Akucheck tesztesíkok pontosságát Roche Reflotron plus tesztesík automata (Roche, Basel, Switzerland) segítségével validáltuk.

A plazma inzulin szinteket éjszakai éheztetést követően, ill. az OGTT során 120 perccel a gyomorszondán lejtuttatott 20 mg/100tsg glukóz oldat adását követően mértük. Az inzulin szintek mérésére Rat/Mouse Insulin ELISA-át használtunk (Millipore Ltd., Billarica, MA, USA). A fruktózamin szintet Roche 930010 teszttel (Roche, Basel, Switzerland) mértünk. A 8 hetes DHT-kezelést követően rögzítettük minden állat testsúlyát.

5.10 Patkányokból izolált aorta funkcionális vizsgálata miográffal

A vizsgálatot a korábban leírtakkal azonos módon készítettük elő.

Az aorta gyűrűkőn 124 mmol/l káliumos Krebs oldattal referencia kontrakciót hoztunk létre. 20 perccel később 5×10^{-8} M koncentrációjú NA-nal hoztunk létre stabil és tartós kontrakciót. Az inzulinnal indukált relaxációs válaszokat vizsgáltunk egyre növekvő inzulin koncentrációk (50-150-300-600 mU/ml) adásával NA-nal prekontrahált éren.

Kétféle gátlószert használtunk. Az erek egyik felét 10^{-4} M indometacinnal, a másik felét 10^{-4} M L-NAME-mel inkubáltuk 20 percig, majd megismételtük a prekontrakciót, és az inzulin adagolását. Ezzel két különböző hatásmechanizmust szeretnénk volna vizsgálni. Az indometacin a prosztanoidokat blokkolja, az L-NAME pedig általános gátlószere a NOS enzimeknek (mindhárom izoformának).

Minden egyes prekontrakciós és azt követő relaxációs válaszok regisztrálása után alaposan átmostuk az ereket Krebs oldattal, majd 20 perc regenerációs időt hagytunk.

5.11 Patkány ováriumok szövettani vizsgálata

Az ováriumokat kipreparáltuk, 4 %-os formaldehidben fixáltuk és hematoxilin-eozinnal festettük. Manner és Yanes korábbi kutatásainak megfelelően policisztás morfológiára számítottunk a DHT-kezelt csoportban, és normál morfológiára a kontroll csoportban (153; 155). Morfometriai kiértékelést a Panoramic Viewer szoftver (DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary) segítségével végeztünk.

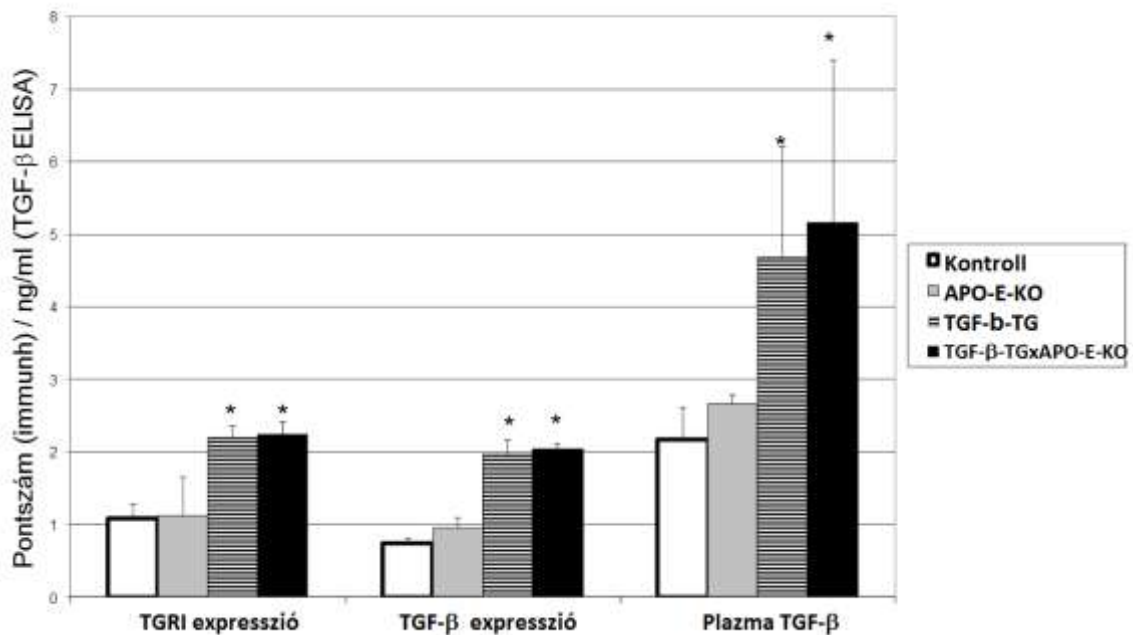
5.12 Statisztika

A dózis-hatás görbéket kétszemponos ismétléses variancia analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. A folytonos paramétereket egyszemponos vagy kétszemponos ANOVA teszttel és Tukey's post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. A diszkrét paraméterekhez (pl. pontozás) nem paraméteres Kruskal-Wallis ANOVA-t és Mann-Whitney U-tesztet használtunk. Eredményeinket átlag \pm átlag szórása (SD) formában adtuk meg. Szignifikánsnak a $P < 0.05$ értékeket tekintettük.

6 Eredmények

6.1 TGF- β és TGF- β receptor immunhisztokémia egér aortában és plazma TGF- β -szint meghatározás ELISA-val

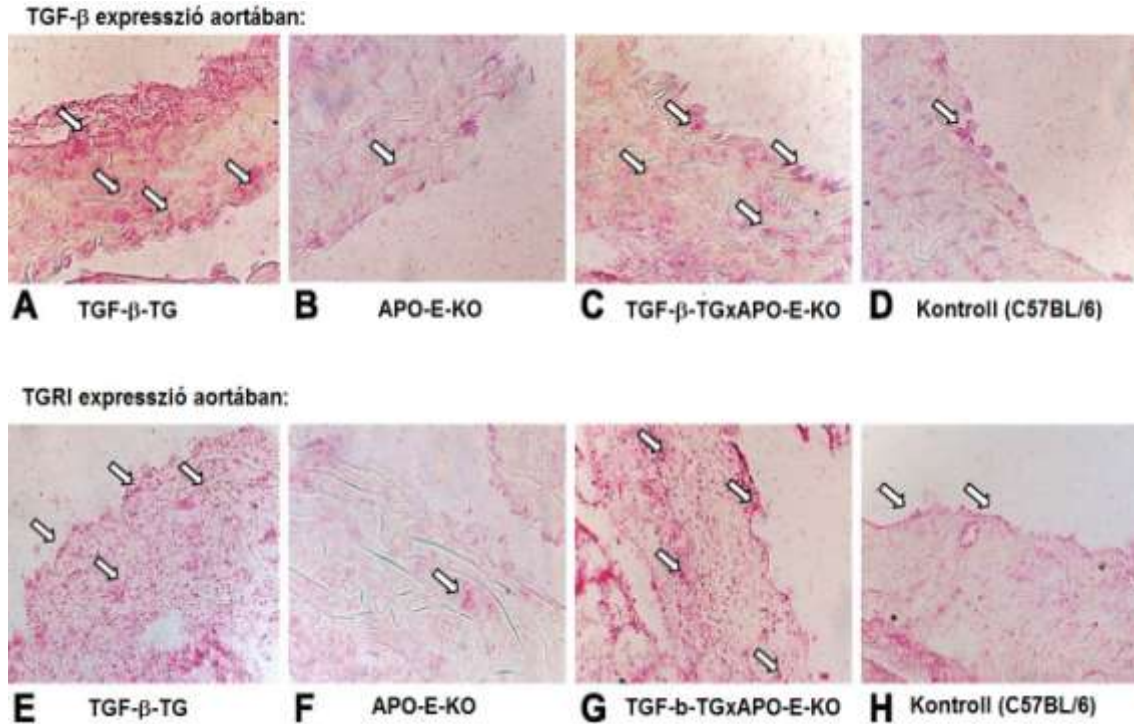
A TGF- β expresszió és a TGRI expresszió is emelkedett a transzgenikus és a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsekben (14. ábra). Továbbá, a transzgenikus (TGF- β -TG és TGF- β -TGxAPO-E-KO) törzsekben megközelítőleg kétszeres plazma TGF- β szinteket mértünk a kontrollhoz képest.



* $p < 0,05$ vs. kontroll (n=8/csoport)

14. ábra: Az immunfestés intenzitásának értékelése

Az első és második blokkban a TGRI receptor és TGF- β immunfestés, a harmadik blokkban a TGF- β ELISA eredményei láthatók az egyes csoportokban (oszlopok).



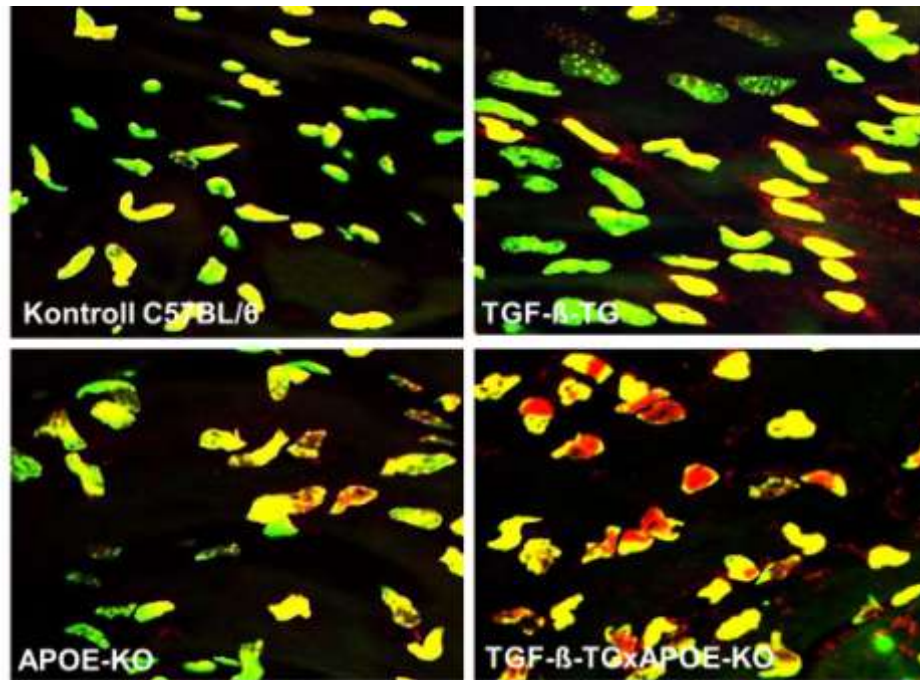
15. ábra: Illusztratív felvételek az immunfestésről aortában

Az első sorban a TGF- β expressziót mutató felvételek, a második sorban a TGRI expressziót mutató felvételek láthatók minden kísérleti csoportból.

(165)

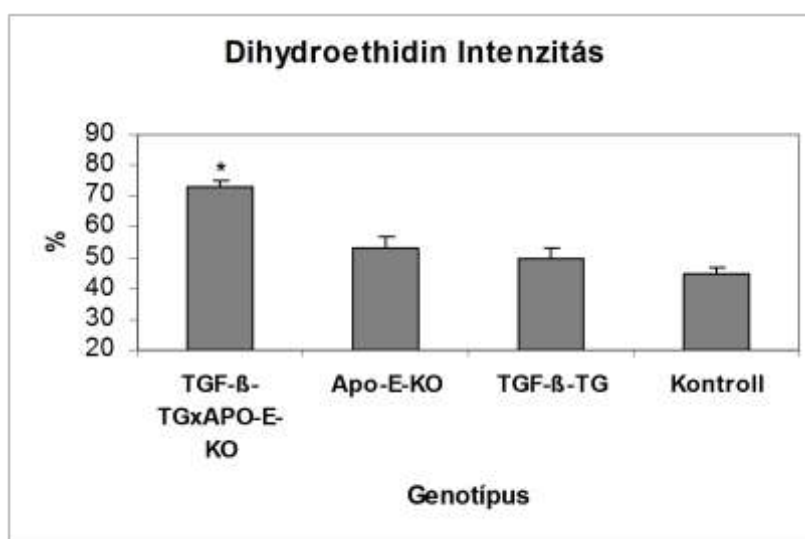
6.2 Szuperoxid kimutatás

A kontrollhoz (C57BL/6) képest a TGF- β -TGxAPO-E-KO állatokról készült felvételeken látjuk a legintenzívebb festődést. (16. ábra) Szoftveres kiértékelést követően a szignifikáns intenzitás-növekedést találtunk a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben. (17. ábra)



16. ábra: Szuperoxid kimutatás dihidroetidin (DHE) festéssel az endotél rétegben; konfokális mikroszkóppal készült illusztratív felvételek

A nyilak egy-egy sejtmagot mutatnak az endotél rétegben. A festődés mértéke az adott csoportra jellemző a kiemelt sejtmagokban. A szuperoxid termelést nem mutató - nem festődött - sejtmagok zölden, az enyhén festődött magok zöldessárgán, az erőteljesen festődött - intenzív szuperoxid termelést folytató - magok sárgán, vagy sárgás-pirosan világítanak.

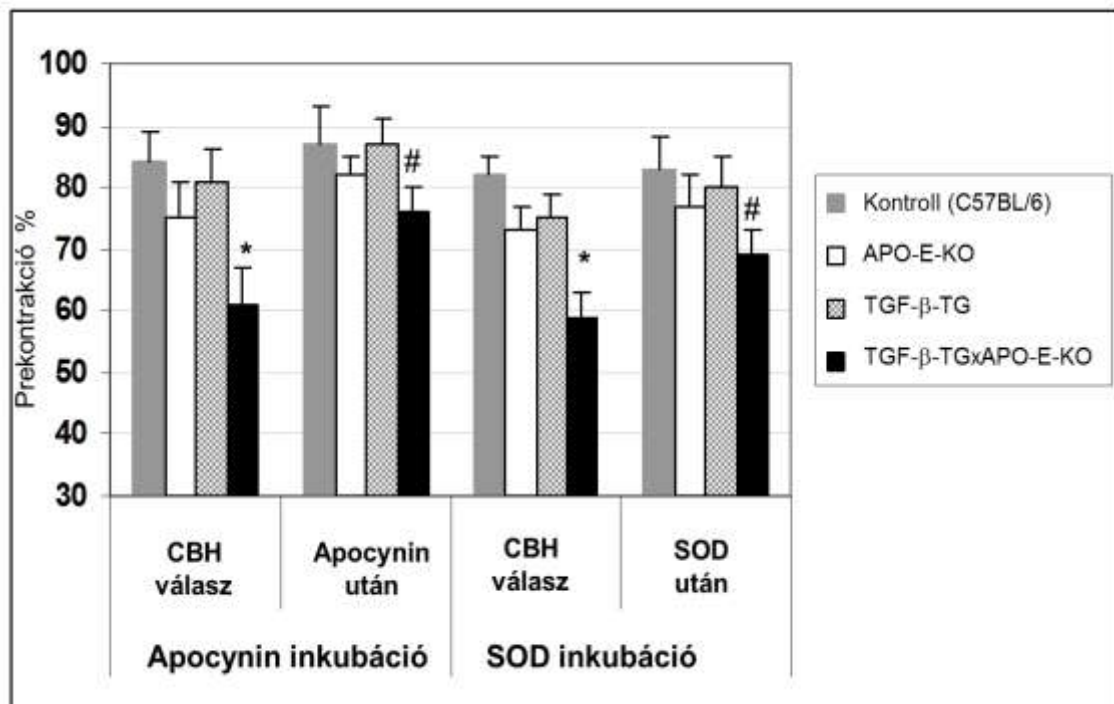


17. ábra: A dihidroetidin festődés intenzitása a különböző csoportokban (n=8) (*p<0,005 vs. kontroll (C57BL/6), APO-E-KO, TGF-β-TG)

6.3 Egérből izolált aortagyűrű funkcionális vizsgálata miográfval

Az egyszeresen módosított törzseknél a NO-függő relaxáció csökkenő tendenciát mutatott a kontrollhoz képest, de ez az eltérés nem volt szignifikáns. A TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsből azonban szignifikáns csökkenést találtunk a C57BL/6 kontrollhoz képest.

Az I. protokollban használt apocynin inkubációt követően a relaxációs válaszok a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsből szignifikáns javulást mutattak. A II. protokollban a SOD inkubáció hatására a relaxációs változások szintén szignifikánsan javultak a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzs esetében (18. ábra).



18. ábra: Karbakollal (CBH) indukált relaxáció az egér torakális aortában

* $p < 0.05$ vs. többi csoport # $p < 0.05$ inkubáció előtt vs. inkubáció után

($n=10$ /csoport)

6.4 Vérnyomásmérés egerekben

A legmagasabb vérnyomás értékeket a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben mértük. Ebben a csoportban volt a kontrollhoz képest a legnagyobb eltérés. A kontrollhoz (C57BL/6) képest az APO-E-KO törzsben is szignifikánsan emelkedett a vérnyomás. A TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben azonban az APO-E-KO törzshöz képest is szignifikánsan emelkedett vérnyomást mértünk. A *IV. táblázatban* a különböző csoportok vérnyomás eredményei láthatók.

IV. táblázat: A vérnyomás mérés eredményei az egyes csoportokban;

* $p < 0.05$ vs. kontroll (C57BL/6), # $p < 0.05$ vs. APO-E-KO ($n=8$ /csoport)

	BP szisztolés	BP diasztolés
Kontroll (C57BL/6)	77 \pm 8	58 \pm 7
APO-E-KOxTGF-β-TG	121 \pm 10* [#]	90 \pm 11* [#]
APO-E-KO	97 \pm 7*	75 \pm 8*
TGF-β-TG	78 \pm 8	64 \pm 11

6.5 Morfológiai vizsgálatok

6.5.1 Aorta morfometria

Az APO-E-KO és TGF- β -TG egyszeresen génmódosított törzsekben a fal/lumen-arány tendenciaszerűen megnőtt, azonban szignifikáns megvastagodást csak a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzs esetében találtunk (*V. táblázat*).

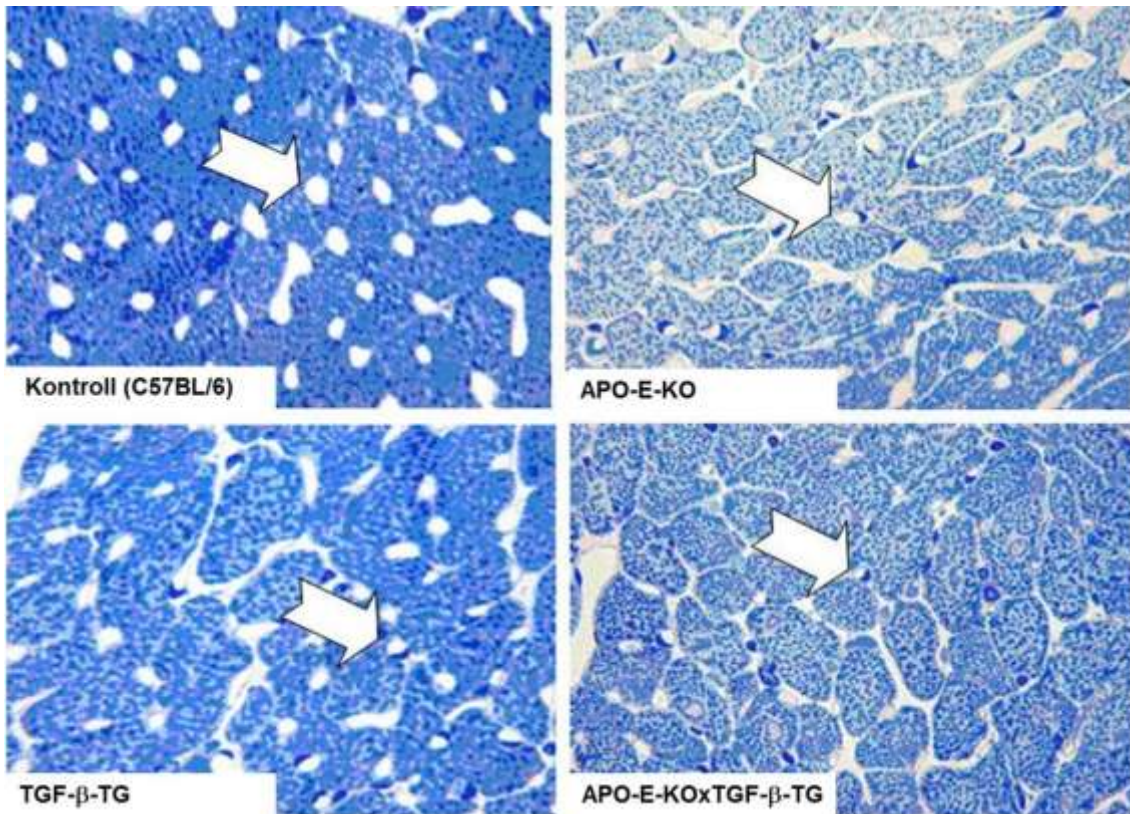
6.5.2 Szív morfológia, sztereológia

A szívek morfológiai és sztereológiai vizsgálata során (*V. táblázat*) a kapilláris hosszúságban és a fibrocita sűrűségben találtunk jelentős eltérést. A TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben a miokardium kapillarizáltsága lényegesen rosszabb volt, mint a kontroll állatokéban. Valamelyest csökkent a kapillarizáltság az egyszeresen génmódosított törzsekben is. A fibrocita sűrűségben pedig mind a TGF- β -TGxAPO-E-KO, mind a TGF- β transzgenikus törzsekben szignifikáns emelkedést láttunk. A félvékony metszetekről készült illusztratív összehasonlítás a *19. ábrán* látható.

V. táblázat: Aorta morfometria és a szív morfológia vizsgálat eredményei:

* $p < 0.05$ vs. kontroll (C57BL/6), # $p < 0.05$ vs. APO-E-KO ($n=8$ /csoport)

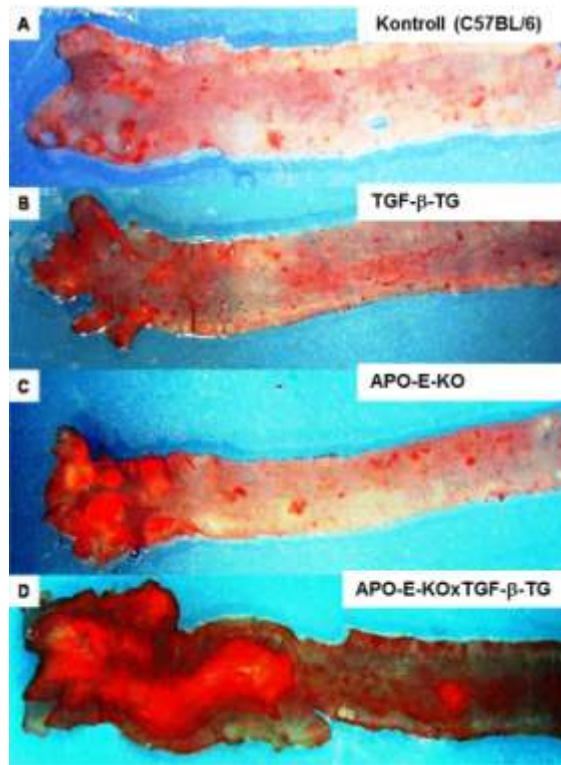
	Miokardium			Aorta
	Relatív kapilláris sűrűség (VV) %	Relatív fibrocita sűrűség (VV) %	Kapilláris hosszúság (LV) mm^2/mm^3	Fal/lumen %
Kontroll (C57BL/6)	4.1%+0.8%	0.8%+0.05%	6484+917	5.5+0.4
TGF-β-TGxAPO-E-KO	2.5+0.9 *	1.1+0.2 *#	4783+394 *	6.9+0.5*
TGF-β-TG	3.0+0.8	1.0+0.1 *#	5328+540	6.3+0.3
APO-E-KO	2.9+0.9	0.8+0.2	5415+814	6.6+0.5



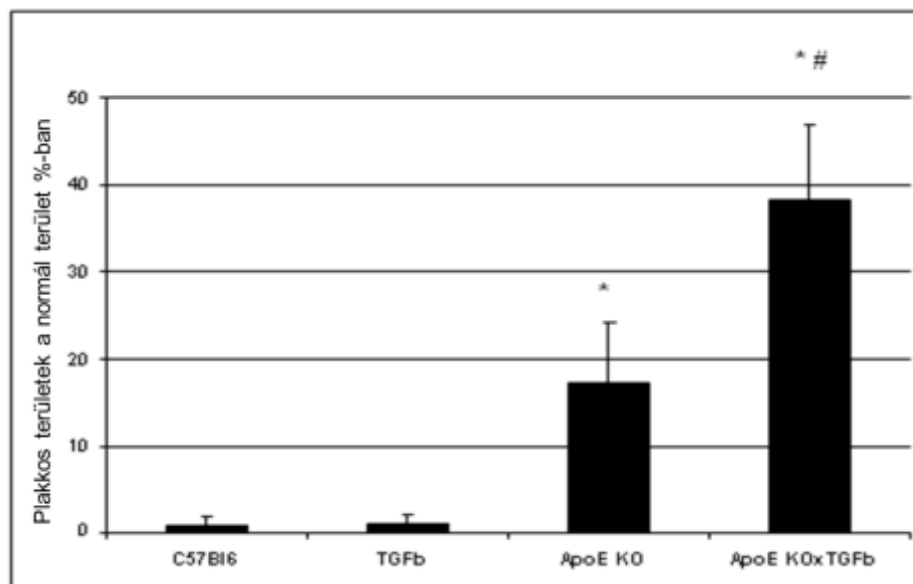
19. ábra A miokardium kapillarizáltsága az egyes törzsekben, félvékony metszeteken (illusztratív összehasonlítás) A nyilak egy-egy kapillárisra mutatnak a különböző csoportokról készült felvételeken. A kapillárisok átmérőjében és sűrűségében is jól látható különbség mutatkozik az egyes csoportok között.

6.6 Zsírfestés egér aortában

A kontroll (C57BL/6) csoportban és a TGF- β -TG törzsben a zsírfestés minimális plakkosodást jelzett. Az APO-E-KO törzsben a zsírfestődés szignifikánsan fokozódott a kontrollhoz (C57BL/6) képest, a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben pedig kifejezetten nagymértékben emelkedett az ateroszklerotikus plakkok területe az APO-E-KO törzshöz képest is (20-21. ábra).



20. ábra: Az ateroszklerotikus területek Oil Red O festés után az egyes csoportokban (illusztratív összehasonlítás) A kontroll és a TGF- β -TG törzsben elhanyagolható, az APO-E-KO törzsben fokozott, és a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben a legerőteljesebb a plakk képződés



21. ábra: A zsírfestés eredményei szoftveres értékelés után

* $p < 0.05$ vs. kontroll (C57BL/6), # $p < 0.05$ vs. APO-E-KO ($n=8$ /csoport)

6.7 Orális Glukóz Tolerancia Teszt, inzulin, és fruktózamin szint meghatározás és testsúlymérés patkányokban

A vizsgálat során nem volt eltérés a glukóz és a fruktózamin értékekben az egyes csoportok között. Szignifikáns különbség mutatkozott azonban a 120 perces inzulin értékek között. A DHT-nal kezelt csoportokban magasabb plazma inzulint mértünk, mint a kontroll csoportban. Ugyanakkor a párhuzamos D-vitamin-kezelésben részesült állatok 120 perces inzulin értékei nem tértek el a kontroll csoporttól. A DHT-nal kezelt csoportokban a kezelés végére emelkedett a testtömeg, ugyanez elmondható a DHT+D-vitaminnal kezelt csoportban is. (VI. táblázat)

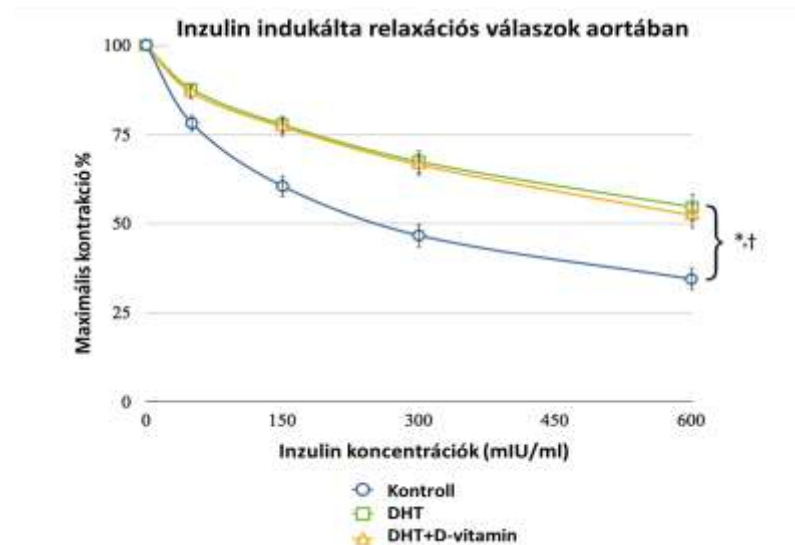
VI. táblázat: OGTT eredmények DHT és DHT+D-vitamin kezelt patkányokban

* $p < 0,05$ vs. kontroll ($n=10$)

	Kontroll	DHT	DHT+D-vitamin
Vércukor 0'	5,31±0,15 mmol/l	5,35±0,24 mmol/l	5,18±0,27 mmol/l
Vércukor 120'	6,11±0,11 mmol/l	6,36±0,2 mmol/l	7,09±0,13 mmol/l
Inzulin 0'	0,42±0,02 ng/ml	0,42±0,03 ng/ml	0,45±0,04 ng/ml
Inzulin 120'	0,71±0,14 ng/ml	1,42±0,33 ng/ml*	0,48±0,07 ng/ml
Fruktózamin	157±3 mmol/l	151±4 mmol/l	156±4 mmol/l
Testsúly	298 ± 8g	354 ± 16g*	353 ± 9g*

6.8 A patkányból izolált aorta funkcionális vizsgálata

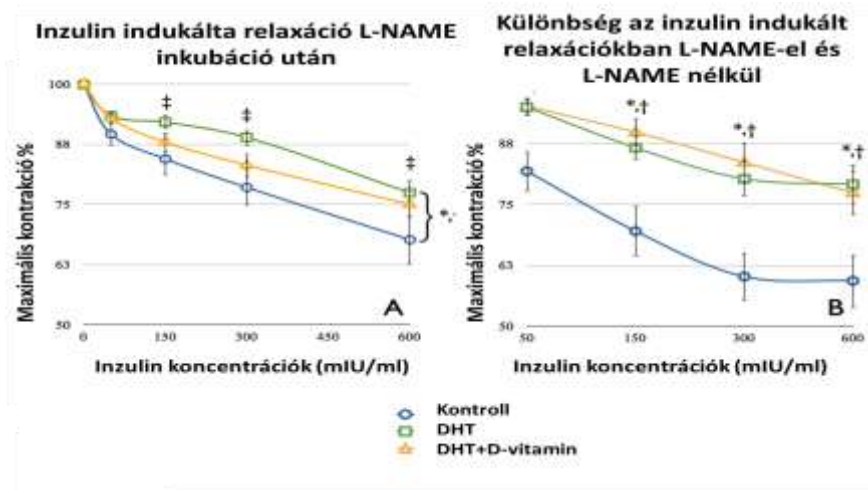
Az DHT csoport és DHT+D csoportból izolált aorták inzulinra adott relaxációs válasza szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest. (22. ábra)



22. ábra: Az inzulinnal indukált relaxációs válaszok patkány aortában

*, †: $p < 0.05$ Kontroll vs. DHT, Kontroll vs. DHT+D ($n=10$)

Inzulin hatására a NOS gátló L-NAME inkubációt követően is létrejött vazorelaxáció, azonban az L-NAME inkubáció nélkül tapasztalt közel 70%-os legnagyobb vazorelaxáció az L-NAME inkubáció után csak 35% volt. A DHT-kezelés az L-NAME inkubáció után is szignifikánsan rontotta az inzulinnal kiváltott vazorelaxációt minden inzulin dózis mellett (23. ábra). A DHT+D csoportban a DHT csoporthoz képest mérsékeltebb volt az inzulinra adott vazorelaxáció csökkenés a 150-600 mIU/ml-es dózis-tartományban.

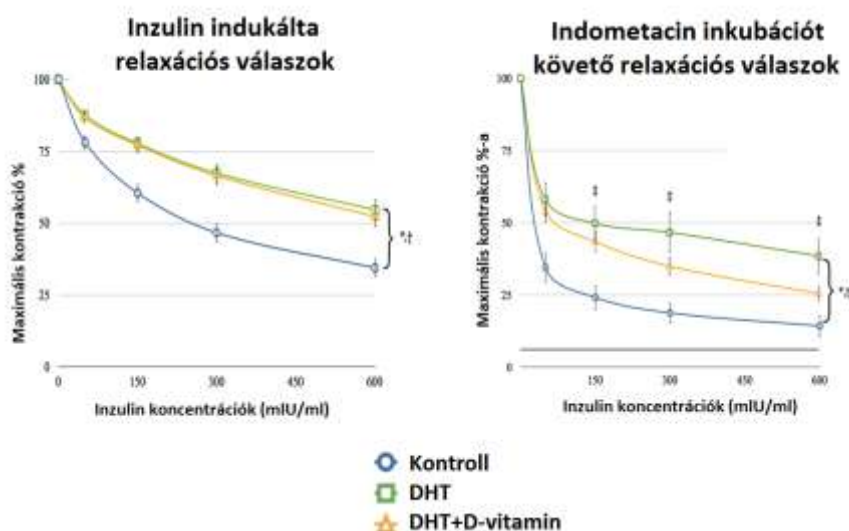


23. ábra: Inzulin válasz L-NAME inkubációt követően

* $p < 0.05$ kontroll vs. DHT, † $p < 0.05$ kontroll vs. DHT+D, ‡ $p < 0.05$ DHT vs. DHT+D

($n=10$)

Az inzulinnal indukált vazorelaxáció indometacin inkubációt követően javult minden csoportban (24. ábra). Az indometacin inkubációt követően a DHT+D csoportban a DHT csoporthoz képest szignifikánsan nagyobb inzulin-függő vazorelaxációt találtunk, azonban ez elmaradt a kontroll csoportétól.



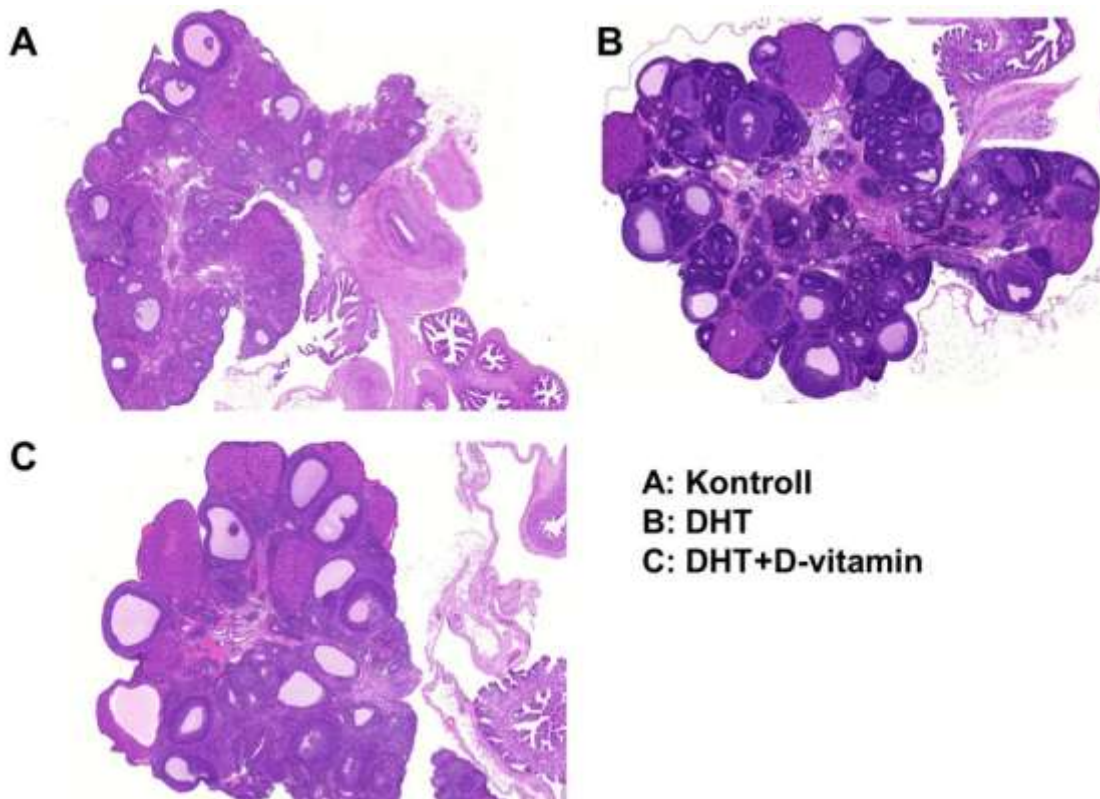
24. ábra: Indometacin inkubációt követő inzulin relaxáció

* $p < 0.05$ kontroll vs. DHT, † $p < 0.05$ kontroll vs. DHT+D, ‡ $p < 0.05$ DHT vs.

DHT+DDHT-nal ($n=10$)

6.9 A patkány ováriumok szövettani vizsgálata

A kontroll csoportban normális morfológiájú ováriumokat, míg a DHT-nal kezelt csoportokban policisztás ováriumokat találtunk. Több ciszta fejlődött ki, azonban domináns tüsző nem volt látható. A tüszők átmérője jellemzően kisebb volt a DHT csoportban a kontrollhoz képest (1609 ± 617 és 2334 ± 451 képpont $40\times$ nagyítás mellett, $p < 0.05$) A DHT+D-vitamin csoportban a tüszők nagysága egyik csoporttól sem tért el szignifikánsan, azonban tendenciáját tekintve a két csoport közé esett (2054 ± 442). A szövettani metszetekről készült illusztratív felvételek a 25. ábrán láthatók.



25. ábra: Ováriumokról készült illusztratív felvételek (hematoxilin-eozin festés)
 A DHT és DHT+D csoportokban policisztás ováriumokat találtunk. Több ciszta fejlődött ki, azonban domináns tüsző nem volt látható.

7 Megbeszélés

7.1 A TGF- β fokozza a ROS felszabadulást az NOX rendszeren keresztül, ami az endotél diszfunkciójához és az ateroszklerózis felgyorsulásához vezet

A TGF- β szerepe ellentmondásos a keringés kórélettanában. Profibrotikus citokinként az érlemezésedés fibrotikus folyamatait gyorsítja (128), ugyanakkor mint a regulátor T-sejtek egyik fő citokinje gyulladáscsökkentő hatást fejt ki (7). Sokat tudunk ugyan a TGF- β lokális gyulladáscsökkentő és profibrotikus hatásairól, azonban szisztémásan emelkedett szintjének vaszkuláris hatásai nem tisztázottak.

Azok a kutatások, amelyek szerint a TGF- β túltermelés emelkedett vaszkuláris szabadgyök felszabadulással, és endotél diszfunkcióval jár, új dimenziókat nyitottak meg eddigi ismereteink tekintetében (10; 166; 167). Eredményeink alátámasztják a TGF- β endotél károsító hatását az ateroszklerózisra hajlamos egérmodellben. Mindemellett azt is kimutattuk, hogy a TGF- β által indukált NADPH oxidáz aktiváció és az endotél funkció romlása, hosszútávon az ateroszklerotikus plakkok növekedéséhez, a vérnyomás emelkedéséhez, és a szív fibrózisához, ill. megnagyobbodásához vezet.

Kísérleteink során emelkedett TGF- β szinttel rendelkező, 4 hónapos, APO-E-KO egerekből izolált aorta-gyűrűkön csökkent endotél-függő relaxációt találtunk. Ebből arra következtetünk, hogy a keringő TGF- β koncentráció emelkedése súlyosbítja az APO-E-KO egerekben kialakuló endotél diszfunkciót és ateroszklerózist.

A TGF- β szerepe az ateroszklerózisban vitatott téma. Azon tanulmányok, amelyek TGF- β gyulladáscsökkentő hatásait hangsúlyozzák, arra következtetnek, hogy a TGF- β döntően ateroprotektív (168). A profibrotikus hatásait alapul vevő tanulmányok a TGF- β plakk stabilizáló hatására, szintén mint jótékony hatásra hívják fel a figyelmet (13),(14). Ezekben a kutatásokban a protektív citokin elmélet jegyében a TGF- β lokális hatásait vizsgálták az érfalban (168), vagy a T-sejtek TGF- β termelését

blokkolva vizsgálták annak következményeit (15). Ezek a tanulmányok a TGF- β lokális, endogén termelését vizsgálták, és a gyulladáscsökkentő hatásaira koncentráltak.

Egy közelmúltban végzett kutatás például a TGF- β ateroszklerózisra és aneurizma képződésre kifejtett hatását vizsgálta. Az alkalmazott modellben a doxiciklinnel TGF- β 1-túltermelést indukáltak a szívben, APO-E-KO egereken. Az így megemelkedett kardiális TGF- β expresszió hatására csökkent az ateroszklerotikus léziók, és pszeudoaneurizmák száma. A kevesebb lézió és pszeudoaneurizma okaként a csökkent T-limfocita infiltrációt és csökkent gyulladáscsökkentő citokin expressziót, ill. a csökkent metalloproteináz aktivációt mutatták ki. Ezen tanulmány szintén a kardiális TGF- β 1 túltermelés lokális, ill. gyulladáscsökkentő hatásaira koncentrált, nem vizsgálva a keringő TGF- β érszintű hatásait (146).

Kísérleteink további részében az oxidatív stressz gátlására NOX inhibitor (apocynin) és szuperoxid-semlegesítő SOD enzimet használtunk, így vizsgáltuk a TGF- β által kiváltott endotél diszfunkcióban szerepet játszó mechanizmusokat. Mindkét gátlószer részben helyreállította az endotél-függő relaxációt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben kialakult endotél diszfunkcióért a TGF- β indukálta NOX rendszer, és a hatására kialakuló ROS túltermelés felelős.

Vizsgálatunkat megelőzően még nem volt adat a szisztémásan emelkedett TGF- β szint endotél funkcióra és az erek oxidatív egyensúlyára gyakorolt hatására ateroszklerózisra hajlamos egérmodellben. Azt leírták korábban, hogy a TGF- β serkenti a NOX rendszer enzimeinek szintézisét, és így a szuperoxid termelést is az ér endotél rétegében. Kimutatták, hogy a TGF- β a NOX4-en keresztül indukálja a ROS felszabadulást, és a citoskeleton átalakulását humán endotél sejtekben (10), (167). Kimutatták továbbá, hogy az oxidatív stressz a vaszkuláris endotél sérüléséhez, és diszfunkciójához vezet (166). További eredmények utalnak arra, hogy TGF- β hatására jön létre a kardiális fibroblasztok differenciálódása miofibroblasztokká, és az extracelluláris matrix szintézise a NOX4-SMAD2/3 útvonalon keresztül (17).

Szuperoxid kimutatással igazoltuk, hogy az TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben kialakult endotél-függő relaxáció-csökkenés hátterében részben az endotél sejtek emelkedett szuperoxid termelése áll.

A TGF- β stimulálja a ROS termelést számos sejtípusban, mint például humán tüdő-simaizomban, tüdő-fibroblasztokban, vagy hepatóma sejtekben (11; 18; 169; 170),

sőt, endotél sejtekben is (16). A ROS termelésnek az érfalban a NOX enzimesalád a fő forrása (171). Ezt a redox-szenzitív jelátviteli útvonalat a humán endotélben a TGF- β aktiválja, és akár át is billentheti túltermelés irányába (10; 172).

7.2 A TGF- β hosszútávon elősegíti a vérnyomás emelkedését, a plakk-képződést, és a szívizom fibrotikus átalakulását

Az endotél diszfunkció fontos szerepet játszik az ateroszklerózis, és a hipertónia patomechanizmusában (173),(4). Kutatásunk során kimutattuk, hogy a magas keringő TGF- β szint 8 hónapos TGF- β -TGxAPO-E-KO egerekben az APO-E-KO törzsnél is magasabb vérnyomáshoz vezetett.

A NOX stimuláció mellett a különböző faktorokon keresztül a vaszkuláris remodellingre és az endotél funkcióra gyakorolt további, indirekt TGF- β hatásokat leírtak már korábban. Az aktivált trombocitákból felszabaduló TGF- β az endotél sejtek ET termelését fokozva részt vesz a sebgyógyulásban, és a lokális vaszkuláris tónus szabályozásában. Így, a TGF- β túltermelés az endoteliális NOX enzimek, ill. ET izoformák felszabadulását fokozva vérnyomás-emelkedést is okozhat (174).

Hosszútávon, a 8 hónapos TGF- β -TGxAPO-E-KO törzsben a plakk-képződés jelentősen fokozódott, ezen kívül a szövettani vizsgálatokkal az aorta fal megvastagodását és a miokardium fibrotikus átépülését mutattuk ki. Ez egybevág egy korábbi tanulmányban közöltekkel, miszerint a TGF- β túltermelés a NOX közvetítésével miokardiális hipertrófiához és fibrózishoz vezet egérben (175).

A TGF- β profibrotikus hatásai közé tartozik, hogy az epitelsejtek miofibroblasztá történő transzdifferentiációját (EMT) okozza. A miofibroblasztok fokozott ECM szintézise fontos szerepet játszik az intersticiális fibrózis folyamatában (176). Az EMT a vese fibrózis kórfolyamatának is fontos része lehet (177). A TGF- β felelős lehet az öregedéshez társuló funkcionális és strukturális átalakulásért is a vesében. A RAS aktivitása és válaszkészsége a kor előrehaladtával csökken. A TGF- β termelés fokozódik, ez a NOX-rendszer stimulációjához, ROS túltermeléshez, majd vaszkuláris, mezangiális sejtproliferációhoz és hipertrófiához vezethet. (178). A TGF- β ugyancsak proliferációért felelős a pulmonális arteriola simaizomban, a NOX4 aktivációján és a ROS túltermelésén keresztül (11).

A direkt profibrotikus hatásai mellett a TGF- β a szívizomban is hipertrófiát, fibrózist, és strukturális remodellinget indukál (179),(180). Számos szívbetegséghez társul emelkedett TGF- β expresszió, különösen a kardiális hipertrófiától a szívelégtelenségig tartó átalakulás során. A TGF- β csökkenti a szívizomsejtek kontraktilitását, amiért szintén a fokozott ROS termelés, és a Ca²⁺-függő proteinek oxidatív károsodása felelős (181). A szívizom-hipertrófia kialakulása a miociták megnagyobbodásán kívül az intersticiális fibroblaszt-proliferációnak és az ECM szintézisnek is köszönhető (125).

A TGF- β profibrotikus hatásait számos növekedési faktor befolyásolhatja indirekt módon. A TGF- β serkenti a plazminogén aktivátor inhibitor (PAI-1) expresszióját a vaszkuláris simaizomban. Az emelkedett PAI-1 szintet összefüggésbe hozták a trombózis kialakulásával, a fibrotikus folyamatokkal és a remodellinggel (182). Ezen kívül a TGF- β aktiválja a PDGF-B szintézist az endotél sejtekben, amellyel hozzájárul a FGF és CTGF felszabadulásához a szubendoteliális mátrixból. Stimulálja továbbá a Vaszkuláris Endotél Növekedési Faktor (VEGF) szintézisét is. Az endotél sejtől felszabaduló PDGF-B és FGF befolyásolja a szomszédos sejtek proliferációját és migrációját. Összességében ezek a mediátorok szabályozzák az angiogenezist és az ér regenerációs képességét. Így, az endotél sejt és a TGF- β -endotél kölcsönhatás fontos szerepet játszik az ateroszklerózis kezdeti, döntően immun-folyamatok mediálta, és a késői, remodellinggel járó szakaszában is (183).

A TGF- β mRNS és fehérje szintézise az érfalban, mechanikai hatásra vagy érsérülésre is fokozódhat, főként a simaizom szövetben és a makrofágokban (184). Az ANG II is indukálhatja a TGF- β termelést az ér simaizomban (185), de ANG II hatására közvetlenül aktiválódhat a SMAD jelátviteli út vonal, akár a TGF- β -tól függetlenül is. Továbbá, az ANG II több intracelluláris jelátviteli mechanizmust a TGF- β -val közösen használ a fibrotikus folyamatok során (186). Mindezek alapján feltételezhető a TGF- β és az ANG II közötti kölcsönhatás, párhuzamos szabályozás, mind a fibrotikus, mind a vaszkuláris folyamatok, pl. ateroszklerózis kapcsán.

Mindazonáltal a TGF- β képes fokozni saját termelődését is, önerősítő jelleggel, amely a krónikus hegesedés, plakk-képződés, ill. fibrózis szempontjából fontos tényező lehet. A TGF- β indukálta TGF- β expresszió állhat a TGF- β -TG törzsek aortáiban megfigyelt TGF- β túltermelés hátterében is. A TGF- β transzgénnel rendelkező

törzsekben (TGF- β -TG \times APO-E-KO és TGF- β -TG) emelkedett TGR-I expressziót is találtunk. Ennek hátterében egy korábban már leírt mechanizmus állhat, miszerint a TGF- β emelkedés TGR-I upregulációval járhat (187).

Érdekes módon kísérleteink során önmagában az emelkedett TGF- β szint nem volt elegendő, hogy az aorta relaxációjában jelentős csökkenést, a vérnyomásban emelkedést, és aortában és szívben fibrotikus átépülést váltson ki a TGF- β -TG törzsben. Ennek a lehetséges magyarázata az, hogy az APO-E-KO egerekben az oxidált LDL és egyéb lipidek lerakódása, és ezzel együtt járó gyulladáshoz vezető folyamatok következtében már fennáll az érfal bizonyos mértékű gyulladása, ill. sérülése, ami szükséges ahhoz, hogy a TGF- β endotél károsító és aterogén hatása érvényesüljön.

7.3 A TGF- β emelkedett szintje, mint rizikófaktor humán betegségekben

Alábbiakban tárgyalunk néhány jelentősebb kutatást, amelyekben a TGF- β emelkedett szintjét összefüggésbe hozták az érrelmeszesedéssel, emberben. Az elmúlt években számos tanulmány alátámasztja, hogy a magas keringő TGF- β szint felgyorsult ateroszklerózissal jár. Aterektómián átesett, primer vagy szekunder ateroszklerotikus betegségben szenvedő betegek femorális artériából nyert mintáinak vizsgálata során a TGF- β alapvető szerepét mutatták ki az ateroszklerózis folyamatában. A SMAD-3 jelátviteli útvonalon keresztül a TGF- β simaizom proliferációt indukált, resztenozist okozva ezekben a betegekben. A resztenotikus léziókban fokozott SMAD-3 expressziót, és nagymértékű simaizom-sejt szaporulatot találtak. A SMAD-3 expresszió emelkedés hatására fokozódott, a SMAD-3 gátlással pedig csökkent a simaizom-proliferáció ezeken a területeken (188). Egy másik tanulmány szerint hipertóniában a TGF- β szint pozitív korrelációt mutatott a betegek BMI-jével, és kreatinin-clearance-ével (189). A gesztációs diabéteszben szenvedő, elhízott nők esetében szignifikánsan magasabb TGF- β szintet találtak, mint az egészséges populációban. Ezekben a nőkben a szérum TGF- β -szint korrelált a posztprandiális glukóz értékekkel, a korral és a BMI-vel is (190). Ezek a közlemények, és az általunk közölt eredmények is alátámasztják, hogy a szisztémás keringésben mérhető TGF- β emelkedett szintje rizikófaktorként kezelendő, és a jövőben esetleg új terápiás célpontként is használható az endotél diszfunkcióval és érrelmeszesedéssel járó krónikus betegségek esetében.

7.4 A DHT-kezeléssel indukált policisztás ovárium szindróma patkány modellje

Mai tudásunk szerint a PCOS kialakulásának egyik lényegi faktora a hiperandrogenizmus. A PCOS másik jelentős patogenetikai tényezője a hiperinzulinémia és inzulinrezisztencia, amelynek kialakulásáért részben a hiperandrogén állapot tehető felelőssé (25). A PCOS-ban kialakult inzulin-függő érválaszokat ezért DHT-kezeléssel indukált PCOS patkány modellben, aortán vizsgáltuk.

Vizsgálataink során egy elfogadott PCOS patkány modellt használtunk, amelyben DHT-kezelés hatására androgénszint emelkedés és policisztás ovárium alakul ki számos további metabolikus eltéréssel együtt. A modell megalkotói szerint a patkányban 8-12 hetes DHT-kezeléssel indukált PCOS rendkívül hasonló az emberben kialakuló PCOS-hoz, mind a policisztás ováriumok kifejlődése, mind az androgén szintek emelkedése (kb. háromszoros) szempontjából (153; 155).

A munkacsoportunk által végzett DHT-kezelés során szignifikánsan emelkedett a DHT-csoport testsúlya, ezt a súlytöbbletet azonban a D-vitamin terápia nem befolyásolta. Ez a súlytöbblet feltehetően az androgének hatására, az adiponektin-receptorok csökkent expressziója következtében alakulhatott ki. (191) Az emelkedett éhgyomri cukor és inzulin szintekből Yanes-ék arra következtettek, hogy a hiperandrogén állatokban inzulinrezisztencia is kialakul. (155)

Ezt a feltételezést méréseink során igazoltuk. Habár az állatokon végzett OGTT során az éhgyomri glukóz és inzulin szintekben nem találtunk eltérést, a 120 perces inzulin értékek jelentősen magasabbak voltak a DHT-nal kezelt csoportban. Bár 2-es típusú diabétesz még nem alakult ki ezekben az állatokban, az OGTT inzulinrezisztenciát igazolt, így modellünk alkalmasnak bizonyult a PCOS kezdeti és korai szakaszában kialakuló érszintű károsodások és zavarok vizsgálatára. Yanes modelljében magas vérnyomás is kialakult hosszabb (90 napos) DHT-kezelés hatására (155).

Az általunk végzett 70 napos kezelés alatt még nem alakult ki szignifikáns különbség a kísérleti csoportok vérnyomása között, amiből arra következtetünk, hogy kísérletek során észlelt változások a hiperandrogén állapotnak vagy az inzulinrezisztenciának tulajdoníthatók, és függetlenek a vérnyomástól (192). A 90-napos DHT-kezelés további metabolikus eltéréseket is okozott. Fokozódott a spontán

proteinuria, emelkedett a TNF- α , leptin és koleszterin szint, amely fokozott oxidatív stressz és NOX4 aktivitásra utalt (153). Ezek a paraméterek is befolyásolhatják az artériák farmakológia válaszkészségét. A krónikus hiperandrogenizmus direkt érhatásai azonban, szintén fontos szerepet játszanak.

7.5 A hiperandrogén állapot vaszkuláris hatásai

A hiperandrogén állapot direkt érhatásaival kapcsolatban született már néhány tanulmány. Malkin leírta, hogy akut tesztoszteron-kezelés vazodilatációt indukál, míg krónikus kezelés az endotél-függő és endotél független vazorelaxációt is csökkenti. Emellett fokozza a NA-ra adott vazokonstriktív választ (193).

A korábbi eredményekkel összhangban munkacsoportunk a közelmúltban kimutatta, hogy a hiperandrogén állapot a NO-függő relaxációt rontja, hiszen krónikus DHT-kezelés hatására az ACh-relaxáció csökkent patkányban. (194) A NO útvonal blokkolásakor enyhe kontrakciót figyeltünk meg, amely feltételezi a prosztanoid-rendszer és a muszkarin ACh-receptorok aktivációját is (195; 196).

Mind a DHT, mind a tesztoszteron blokkolja az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat, és magas koncentrációban a tesztoszteron azonnali vazorelaxációt vált ki a Ca^{2+} -antagonista hatásának köszönhetően, továbbá csökkenti a cAMP szintet az aortában (197). Gonzales pedig kimutatta agyi artériákon in vitro, hogy tesztoszteron előkezelés hatására csökken a tromboxán-indukálta értónus (196). Az ösztradiollal összehasonlítva gyengébb, de hasonló Ca^{2+} -függő vazorelaxáns hatását írták le patkány aortán, fenilefrin prekontrakciót követően (198). A krónikus, alacsony dózisével tesztoszteron adagolás azonban növeli a miokardiális iszkémia, a lipid eltérések és az inzulinrezisztencia esélyét, köszönhetően vazoaktív és metabolikus hatásainak (199). Emberben, PCOS-ban is mikrovaszkuláris diszfunkciót mutattak ki korábban, amely szintén az ACh-függő vazodilatáció csökkenéséből adódott (100). Az endotél diszfunkcióját és károsodását a gyulladós és szolubilis markerek emelkedése provokálta (200).

7.6 A DHT-indukálta PCOS-ban romlik az inzulin-függő vazodilatáció

PCOS modellünkben csökkent inzulin-függő vazorelaxációt találtunk a DHT-csoportban és a DHT+D-vitamin csoportban is.

Az inzulinnal kiváltott vazorelaxáció csökkenése, az inzulinrezisztencia érszintű megjelenési formája. Korábban is találtak már összefüggést a metabolikus, illetve érszintű inzulinrezisztencia között az öregedéssel kapcsolatban (201). Az ér-szintű inzulinrezisztencia kialakulása humán PCOS-ban, ill. DHT-nal kezelt nőkben régóta ismert jelenség, azonban ezt kísérletes modellben korábban még nem vizsgálták.

Kísérleteink további részében az inzulin-függő relaxáció csökkenésében szerepet játszó mechanizmusokat vizsgáltuk. A NO hatást L-NAME-mel blokkolva a kontroll aorták vazorelaxációja csökkent leginkább, ami a DHT-nal kezelt csoportokban a NO-függő jelátviteli útvonal sérülésére utal. A NO útvonal blokkolása után fennmaradó relaxációs kapacitás azonban azt bizonyítja, hogy egyéb útvonalak is érintettek.

Ahogy azt korábbi közleményekben feltételezték, az inzulin-függő vazodilatáció a NO útvonal aktivációjával jön létre. (61; 202; 203) Emberben, muszkuláris artérián inzulin hatására NO-függő vazodilatáció jött létre (61; 204). Feltételezik azonban, hogy ettől függetlenül a Na-K ATP-áz is szerepet játszhat az inzulin érrelaxáló hatásában (205; 206). Ezzel összhangban a mi eredményeink is arra utalnak, hogy a DHT-kezelés főként a NO-függő relaxáció károsításán keresztül vezet érszintű inzulinrezisztenciához.

7.7 A D-vitamin védőhatása az ér-szintű, illetve szisztémás inzulinrezisztenciára, PCOS-ban

Számos szerző szerint az alacsony D-vitamin szint szerepet játszik az inzulinrezisztencia kialakulásában PCOS-ban. Ennek alapján feltételezik, hogy a PCOS-ban kialakuló inzulinrezisztencia D-vitamin-pótlással helyreállítható (207). T2DM-ben szenvedő betegekben a D-vitamin javította, a D-vitamin-hiány pedig egyértelműen rontotta a brachiális erek áramlás-függő vazodilatációját (208).

A DHT-nal indukált PCOS kapcsán a D-vitamin endotél-funkcióra, ill. ér-szintű és szisztémás inzulinrezisztenciára gyakorolt protektív hatását munkacsoportunk már

vizsgálta. (192; 194) A krónikus D-vitamin-kezelés DHT-indukálta PCOS modellben szignifikánsan javította az aorta ACh-relaxációját (194), kivédte a gracilis artéria inzulinrezisztenciáját (192), és a szisztémás inzulinrezisztencia kialakulását. Érdekes módon azonban, a D-vitamin jótékony hatása nem érvényesült az aorta gyűrűkőn.

Ezek alapján feltételezzük, hogy a gracilis artériában az inzulin-függő relaxáció NO-független útvonalon is működik, míg aortában a NO-függő vazodilatáció dominál, és a D-vitamin főleg a NO-független útvonalak segítségével állítja vissza a normál vaszkuláris tónust. A D-vitamin mikro- és makroerekre gyakorolt hatásai közötti különbség lehetséges magyarázatául tehát a különböző értípusokban működő hasonló mechanizmusok eltérő dominanciája szolgál.

L-NAME inkubációra a D-vitaminnal kezelt erek voltak a legkevésbé érzékenyek. Ebben a csoportban volt a legkisebb a vazorelaxáció-változás az inkubáció előttihez képest, ami arra utal, hogy a D-vitamin-kezelés egyéb NO-független, inzulin-függő relaxációs mechanizmusokat is felerősít. A D-vitamin kedvező hatása a gracilis erek inzulin-függő vazorelaxációjára, és ennek hiánya az aorta inzulin-függő vazorelaxációjára azt valószínűsíti, hogy a D-vitamin hatására a NO-független mechanizmusok felerősödése inkább a mikroerek szintjén jelentkezik. (192) Ilyen mechanizmus lehet például, az EDHF (209), vagy a $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP-áz inzulinfüggő működése. (205; 206)

A korábbi kutatásokban a COX gátlók adására enyhe vazorelaxáns hatást írtak le aortában (210). Ezt a relaxációs hatást mi is megfigyeltük indometacin jelenlétében, minden kísérleti csoportban. Érdekes módon, indometacin jelenlétében a DHT-vel kiváltott inzulin-függő vazorelaxáció-kiesést a D-vitamin-kezelés részben kivédte. Ez alapján feltételezzük, hogy a D-vitamin hatás hiánya az aorta inzulin-relaxációjára előkezelés nélkül, a NO-független relaxációs mechanizmusok és a konstriktor-prosztanoidok hatásának kiegyenlítéséből adódik.

Összességében arra következtethetünk, hogy a D-vitamin lokálisan részben NO-független relaxációs mechanizmusok, részben a konstriktor-prosztanoidok hatását erősíti.

8 Következtetések

A szisztémásan keringő TGF- β emelkedett szintje endotél-diszfunkciót okozott APO-E-KO egérben, a NADPH-oxidáz rendszer stimulációja révén fokozva az oxidatív stresszt. Továbbá, a magas keringő TGF- β aortafal megvastagodást, fokozott plakkképződést, hipertóniát, valamint miokardiális hipertrófiát és fibrózist okozott hosszútávon. A magas keringő TGF- β szint tehát, ateroszklerotikus környezetben, ami egy APO-E-KO állatra jellemző, elősegíti az amúgy is fennálló endotél diszfunkció és ateroszklerózis progresszióját. Ez a mechanizmus magyarázhatja az egyes magas TGF- β szinttel járó állapotok és a felgyorsuló érlemezés közötti kapcsolatot.

PCOS modellünkben a D-vitamin pótlás kivédte az orális glukóz adására létrejövő szérumban inzulin koncentráció-emelkedést, nem akadályozta meg azonban az aortában az inzulinnal kiváltott vazorelaxáció-csökkenést. Eredményeink az androgén hatásra kialakult vaszkuláris-reaktivitás változásának részleges NO-függését mutatják. A D-vitamin neutrális hatása az aortában a lokális vazokonstriktor prosztanoidok, ill. a NO-független relaxáns útvonalak egymást semlegesítő hatásával magyarázható. Tanulmányunkban a normális értónust fenntartó két legfontosabb mechanizmust vizsgáltuk. Elsőként mutattuk ki a makroerek (aorta) érszintű inzulinrezisztenciáját, és a D-vitamin inzulin-háztartásra gyakorolt jótékony, ill. az aortára gyakorolt neutrális hatását PCOS-ban. Ez az első olyan kutatás, amely rámutat annak a lehetőségére, hogy ugyanazon androgén hatás más dominanciával és más útvonalakon keresztül hat, és különböző mértékű endotél károsodást hoz létre a mikro- és makroerekben.

9 Összefoglalás

Kutatásunk célja egyrészt a szisztémásan keringő transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) endotél funkcióra és érlemeszesedésre gyakorolt hatásának, másrészt a dihidrotesztoszteron (DHT)-indukálta polycisztás ovárium szindróma (PCOS)-ban kialakuló ér szintű inzulinrezisztencia és a D-vitamin szerepének vizsgálata volt. Az aorta endotél-függő relaxációját mértük apocynin (NOX gátló), ill. szuperoxid-dizmutáz (ROS bontó enzim) inkubáció előtt és után kontroll (C57BL/6), APO-E knockout (APO-E-KO), TGF- β transzgenikus (TGF- β -TG), és keresztezett (TGF- β -TGxAPO-E-KO) egereken. Szuperoxid kimutatást végeztünk dihidroetidin festéssel az endotél sejtekben, konfokális mikroszkóp segítségével. Aorta és szív morfológiát, „en face” zsírfestést végeztünk aortában, és vérnyomást mértünk. 10 hetes DHT-kezeléssel (83 μ g/nap) PCOS-t indukáltunk Wistar nőstény patkányokon. A DHT-kezelés mellett az állatok fele egyidejű D-vitamin-kezelést is kapott (120ng/ttkg/hét, i.m.). Az inzulin-függő vazodilatációt aorta gyűrűn vizsgáltuk, L-NAME (NOS-gátló), ill. indometacin (ciclooxigenáz-gátló) inkubáció előtt és után. A TGF- β -TGxAPO-E-KO egerekben fokozódott az aortafal szuperoxid termelése, ami rontotta a NO-függő relaxációt. A relaxáció csökkenés apocynin vagy SOD inkubációt követően szignifikánsan javult. A miokardium kapillarizáltsága csökkent, nőtt a fibrocita sűrűség, megvastagodott az aortafal, és emelkedett a vérnyomás az TGF- β -TGxAPO-E-KO egerekben. A PCOS modellben csökkent az inzulin-függő vazorelaxáció, amit a D-vitamin-kezelés nem befolyásolt. DHT-kezelés következtében döntően a NO-függő relaxációs mechanizmusok sérültek. A D-vitamin-kezelés részlegesen javította a NO-függő vazorelaxációt, ezt a hatást azonban a prosztanoid-függő vazokonstriktió semlegesítette. Következtetések: Az emelkedett keringő TGF- β a NOX aktivációján keresztül fokozott oxidatív stresszt, így endotél diszfunkciót okozott, ezzel felgyorsítva az érlemeszesedés korai folyamatait. Következésképpen magas vérnyomás és szívműködés remodelling alakult ki APO-E-KO egerekben. DHT-indukálta PCOS szisztémás és aortában ér-szintű inzulin rezisztenciához vezetett. D-vitamin-kezelés kivédte a szisztémás, de nem az aortában jelentkező inzulin rezisztenciát. Eredményeink segíthetnek a PCOS vagy magas TGF- β szint miatt kialakult endotél diszfunkció és felgyorsult érlemeszesedés jobb megértésében és a patomechanizmuson alapuló új terápiás célpontok azonosításában. (165; 192; 211)

10 Summary

The aim of our studies was to clarify the effects of high circulating, systemic TGF- β levels on endothelial function and atherosclerosis and to examine insulin-dependent vasodilatation of thoracic aorta and the possible modulatory role of vitamin D in a dihydrotestosterone (DHT)-induced polycystic ovary syndrome (PCOS) model. Aortic endothelium dependent relaxation was measured before and after incubation with apocynin (NOX inhibitor), or superoxide dismutase (SOD: ROS scavenger) in control (C57Bl/6), APO-E knockout (APO-E-KO), TGF- β transgenic (TGF- β -TG), and crossbred (TGF- β -TGxAPO-E-KO) mice. Superoxide production within the vessel wall was determined by dihydroethidine staining under confocal microscope. Aortic and myocardial morphometric changes, plaque formation by en face fat staining and blood pressure were determined. PCOS was induced by 10 weeks treatment with DHT (83 μ g/day) in female Wistar rats. Half of the DHT treated animals received vitamin D (120ng/bwkg/week, i.m.). Insulin-dependent vasodilation of isolated aortic rings was compared before and after incubation with L-NAME (NOS inhibitor) or with indomethacin (cyclooxygenase inhibitor). In the aortic wall, superoxide ($O_2^{\cdot-}$) production was enhanced and NO dependent relaxation diminished in TGF- β -TGxAPO-E-KO mice but improved significantly after incubation with apocynin or SOD. Myocardial capillary density was reduced, fibrocyte density increased, aortic wall was thicker, combined lesion area was greater and blood pressure was higher in the TGF- β -TGxAPO-E-KO vs. C57Bl/6 mice. Insulin-dependent vasorelaxation decreased in both DHT-treated groups independently of vitamin D treatment. Following DHT treatment NO-dependent relaxations were impaired. NO-independent relaxation was partially improved by vitamin D treatment, which was neutralized by increased prostanoid-dependent vasoconstriction. Conclusions: Our results demonstrate that elevated circulating TGF- β caused endothelial dysfunction through NADPH oxidase activation-induced oxidative stress, accelerating atherosclerosis and hypertension in APO-E-KO mice. DHT treatment caused deterioration of insulin-induced vasodilation of the aorta. Vitamin D prevented systemic insulin resistance; however, vascular insulin resistance of the aorta was not significantly induced by vitamin D treatment. These findings may provide new therapeutic targets in patients with accelerated atherosclerosis or with PCOS. (165; 192; 211)

11 Irodalomjegyzék

1. Moukdar F, Robidoux J, Lyght O, Pi J, Daniel KW, Collins S. 2009. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *J Lipid Res* 50:59-70
2. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18:655-73
3. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. 2001. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673-8
4. Munro JM, Cotran RS. 1988. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 58:249-61
5. Libby P. 2012. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2045-51
6. Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan Z-Q. 2002. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ res* 91:281-91
7. Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16:137-61
8. Ling E, Robinson DS. 2002. Transforming growth factor-beta1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. *Clin Exp Allergy* 32:175-8
9. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, et al. 1995. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2572-6
10. Hu T, Ramachandrarao SP, Siva S, Valancius C, Zhu Y, et al. 2005. Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF-beta-induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F816-25
11. Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, et al. 2006. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L661-L73

12. Lambeth JD. 2007. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* 43:332-47
13. Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, et al. 2004. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke* 35:2253-7
14. Jiang X, Zeng HS, Guo Y, Zhou ZB, Tang BS, Li FK. 2004. The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chin Med J* 117:1825-9
15. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, et al. 2001. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res* 89:930-4
16. Hertig IA, Hassoun PM, Zulueta JJ, Thannickal VJ, Fanburg BL. 1993. Mechanism of basal and transforming growth factor beta 1 stimulated H₂O₂ release by endothelial cells. *Trans Assoc Am Physicians* 106:179-86
17. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, et al. 2005. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res* 97:900-7
18. Junn E LK, Ju HR, Han SH, Im JY, Kang HS, Lee TH, Bae SY, Lee ZW, and Rhee SG. . 2000. Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-1-induced IL-6 expression. *J Immunol* 165:: 2190-7.
19. Victor VM, Rocha M, Banuls C, Alvarez A, de Pablo C, et al. 2011. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 96:3115-22
20. Motta AB. 2012. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. *Curr Pharm Des* 18:2482-91
21. Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. 2010. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122:42-52

22. Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. 2008. Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:242-6
23. Sukalich S, Guzick D. 2003. Cardiovascular health in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 21:309-15
24. Dokras A. 2008. Cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med* 26:39-44
25. Lakatos P SG. 2009. *Policisztás Ovárium Szindróma*. Budapest: Semmelweis Kiadó
26. Shannon M, Wang Y. 2012. Polycystic ovary syndrome: a common but often unrecognized condition. *J Midwifery Womens Health* 57:221-30
27. Hirase T, Node K. 2012. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302:H499-505
28. Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. 2003. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 108:2172-83
29. Wedel B, Garbers D. 2001. The guanylyl cyclase family at Y2K. *Annu Rev Physiol* 63:215-33
30. Feletou M, Vanhoutte PM. 2000. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 21:1-18
31. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. 2002. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in pharmacological sciences* 23:374-80
32. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-5
33. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. 2011. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164:894-912
34. Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, et al. 2012. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis* 223:86-94

35. Laplante MA, de Champlain J. 2006. The interrelation of the angiotensin and endothelin systems on the modulation of NAD(P)H oxidase. *Can J Physiol Pharmacol* 84:21-8
36. Carey RM, Siragy HM. 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 24:261-71
37. Wong WT, Tian XY, Huang Y. 2012. Endothelial Dysfunction in Diabetes and Hypertension: Cross Talk in RAS, BMP4 and ROS-dependent COX-2-derived Prostanoids. *J Cardiovasc Pharmacol*
38. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. 1988. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl* 6:S188-91
39. Rubanyi GM. 1991. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem* 46:27-36
40. Sandoo A VZJ, Metsios GS, Carroll D, Kitis GD. . 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. . pp;4:302-312. . *Open Cardiovasc Med J*.
41. Alexander RW, Griendling KK. 1996. Signal transduction in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl* 14:S51-4
42. Wilson SJ, Cavanagh CC, Leshner AM, Frey AJ, Russell SE, Smyth EM. 2009. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. *J Lipid Res* 50:1047-56
43. Liu CQ, Leung FP, Wong SL, Wong WT, Lau CW, et al. 2009. Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: the role of Rho kinase. *Biochem pharmacol* 78:374-81
44. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. 2009. Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res* 50 Suppl:S423-8
45. Yu Y, Lucitt MB, Stubbe J, Cheng Y, Friis UG, et al. 2009. Prostaglandin F₂α elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7985-90
46. Tsikas D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 851:51-70

47. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. 1984. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 Suppl 2:S336-43
48. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1988. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12:365-72
49. Pohl U, Dezsi L, Simon B, Busse R. 1987. Selective inhibition of endothelium-dependent dilation in resistance-sized vessels in vivo. *The Am J Physiol* 253:H234-9
50. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-12
51. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, et al. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-31
52. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. 1998. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773-90
53. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, et al. 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6:1362-7
54. Ignarro LJ. 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53:503-14
55. Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. 2000. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 48:13-22
56. Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. 1986. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 237:893-900
57. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. 1991. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40:923-31
58. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3375-8

59. Dezsi L, Simon B, Pohl U, Busse R, Bassenge E. 1990. Regulation of femoral vascular resistance by adenine nucleotides via endothelial and smooth muscle receptors. *Acta Physiol Hung* 75:21-7
60. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. 1994. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171:944-8
61. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. 1994. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94:1172-9
62. Dezsi L, Dornyei G, Szentivanyi M, Jr., Tulassay T, Monos E. 1997. Somatostatin induces vasodilatation in the cat mesenteric artery via endothelium-derived nitric oxide and prostaglandins. *Pflugers Arch* 433:536-8
63. Wong SL, Wong WT, Tian XY, Lau CW, Huang Y. 2010. Prostaglandins in action indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. *Adv Pharmacol* 60:61-83
64. Miller YI, Choi SH, Fang L, Tsimikas S. 2010. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Sub-cell biochem* 51:229-51
65. Mayet J, Hughes A. 2003. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart* 89:1104-9
66. Sadaba LM, Fernandez-Robredo P, Rodriguez JA, Garcia-Layana A. 2008. Antioxidant effects of vitamins C and E, multivitamin-mineral complex and flavonoids in a model of retinal oxidative stress: the ApoE-deficient mouse. *Exp Eye Res* 86:470-9
67. Unger BS, Patil BM. 2009. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. *Indian J Pharmacol* 41:208-12
68. Anrather J, Racchumi G, Iadecola C. 2006. NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *J Biol Chem* 281:5657-67
69. Manea A, Manea SA, Gafencu AV, Raicu M. 2007. Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells. *Arch Physiol Biochem* 113:163-72

70. Manea A. 2010. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res* 342:325-39
71. Shimizu T, Nojiri H, Kawakami S, Uchiyama S, Shirasawa T. 2010. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase gene. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1:S70-9
72. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, et al. 2006. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 281:33789-801
73. White M, Ducharme A, Ibrahim R, Whittom L, Lavoie J, et al. 2006. Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support. *Clin Sci* 110:483-9
74. Zalba G, Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Beloqui O, Diez J. 2007. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovasc Dis* 24 Suppl 1:24-9
75. Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181-9
76. Paravicini TM, Touyz RM. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* 31 Suppl 2:S170-80
77. Krause KH. 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57:S28-9
78. Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313
79. Zou MH, Shi C, Cohen RA. 2002. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 109:817-26
80. Harrison D. 2006. *Oxidative events in cell and vascular biology* Abingdon (UK): Taylor & Francis Medical Books
81. Murray J, Oquendo CE, Willis JH, Marusich MF, Capaldi RA. 2008. Monitoring oxidative and nitrative modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1497-503

82. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. 2002. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1761-8
83. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. 1994. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14:605-16
84. Eich DM, Johnson DE, Hastillo A, Thompson JA, Barnhart GR, et al. 1990. Accelerated coronary atherosclerosis in cardiac transplantation. *Cardiovasc Clin* 20:199-211
85. Hill GS, Nochy D, Loupy A. 2010. Accelerated arteriosclerosis: a form of transplant arteriopathy. *Curr Opin Organ Transplant* 15:11-5
86. Libby P. 2007. *A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Elsevier, Saunders
87. Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. 1995. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol today* 16:27-33
88. Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, et al. 1997. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J* 11:1199-207
89. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:29-38
90. Channon KM, Guzik TJ. 2002. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol* 53:515-24
91. Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA. 2000. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1707-15
92. Davi G, Falco A. 2005. Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. *Lupus* 14:760-4
93. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. 2000. Weight gain-induced blood pressure elevation. *Hypertension* 35:1135-40
94. Delli Gatti C, Osto E, Kouroedov A, Eto M, Shaw S, et al. 2008. Pulsatile stretch induces release of angiotensin II and oxidative stress in human

- endothelial cells: effects of ACE inhibition and AT1 receptor antagonism. *Clin Exp Hypertens* 30:616-27
95. Devereux RB, Roman MJ, Ganau A, de Simone G, Okin PM, Kligfield P. 1994. Cardiac and arterial hypertrophy and atherosclerosis in hypertension. *Hypertension* 23:802-9
 96. Baba T, Endo T, Honnma H, Kitajima Y, Hayashi T, et al. 2007. Association between polycystic ovary syndrome and female-to-male transsexuality. *Hum reprod* 22:1011-6
 97. Seow KM, Juan CC, Hsu YP, Hwang JL, Huang LW, Ho LT. 2007. Amelioration of insulin resistance in women with PCOS via reduced insulin receptor substrate-1 Ser312 phosphorylation following laparoscopic ovarian electrocautery. *Hum reprod* 22:1003-10
 98. Moran C, Huerta R, Conway-Myers BA, Hines GA, Azziz R. 2001. Altered autophosphorylation of the insulin receptor in the ovary of a woman with polycystic ovary syndrome. *Fertil steril* 75:625-8
 99. 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* 96:801-10
 100. Lakhani K, Leonard A, Seifalian AM, Hardiman P. 2005. Microvascular dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum reprod* 20:3219-24
 101. Orio F, Jr., Palomba S, Spinelli L, Cascella T, Tauchmanova L, et al. 2004. The cardiovascular risk of young women with polycystic ovary syndrome: an observational, analytical, prospective case-control study. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3696-701
 102. Orio F, Jr., Palomba S, Cascella T, De Simone B, Di Biase S, et al. 2004. Early impairment of endothelial structure and function in young normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4588-93
 103. Talbott EO, Guzick DS, Sutton-Tyrrell K, McHugh-Pemu KP, Zborowski JV, et al. 2000. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2414-21

104. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. 1996. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97:2601-10
105. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. 2007. Effects of medical therapy on insulin resistance and the cardiovascular system in polycystic ovary syndrome. *Diabetes care* 30:471-8
106. Forrest KY, Stuhldreher WL. 2011. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr Res* 31:48-54
107. Holick MF, Chen TC. 2008. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87:1080S-6S
108. Thomson RL, Spedding S, Buckley JD. 2012. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 77:343-50
109. Firouzabadi R, Aflatoonian A, Modarresi S, Sekhavat L, MohammadTaheri S. 2012. Therapeutic effects of calcium & vitamin D supplementation in women with PCOS. *Complement Ther Clin Pract* 18:85-8
110. Li HW, Brereton RE, Anderson RA, Wallace AM, Ho CK. 2011. Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 60:1475-81
111. Rahimi-Ardabili H, Pourghassem Gargari B, Farzadi L. 2012. Effects of vitamin D on cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome women with vitamin D deficiency. *J Endocrinol Invest*
112. Patra SK, Nasrat H, Goswami B, Jain A. 2012. Vitamin D as a predictor of insulin resistance in Polycystic Ovarian Syndrome. *Diabetes Metab Syndr* 6:146-9
113. 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:H1226-34
114. Somjen D, Posner GH, Stern N. 2006. Less calcemic Vitamin D analogs enhance creatine kinase specific activity and modulate responsiveness to gonadal steroids in the vasculature. *J Steroid Biochem Mol Biol* 101:232-8

115. Wehr E, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. 2011. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *J Endocrinol Invest* 34:757-63
116. Ardabili HR, Gargari BP, Farzadi L. 2012. Vitamin D supplementation has no effect on insulin resistance assessment in women with polycystic ovary syndrome and vitamin D deficiency. *Nutr Res* 32:195-201
117. Massague J, Xi Q. 2012. TGF-beta control of stem cell differentiation genes. *FEBS lett* 586:1953-8
118. Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-84
119. Whitman M, Raftery L. 2005. TGFbeta signaling at the summit. *Development* 132:4205-10
120. Massague J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, Lopez-Casillas F, et al. 1992. TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev* 32:99-104
121. Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-91
122. Nuessle JM, Giehl K, Herzog R, Stracke S, Menke A. 2011. TGFbeta1 suppresses vascular smooth muscle cell motility by expression of N-cadherin. *Biol chem* 392:461-74
123. Weiner HL. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3:947-54
124. Grainger DJ. 2004. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:399-404
125. Akiyama-Uchida Y, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Tsukazaki T, et al. 2002. Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 40:148-54
126. Fisher SA, Absher M. 1995. Norepinephrine and ANG II stimulate secretion of TGF-beta by neonatal rat cardiac fibroblasts in vitro. *Am J Physiol* 268:C910-7
127. Mozes MM, Bottinger EP, Jacot TA, Kopp JB. 1999. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 10:271-80

128. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, Muller CK, Leipner C, et al. 2009. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 1792:746-56
129. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, et al. 2011. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Transl Res* 158:235-48
130. P Liptak JK, M Adamczak, K Amann, E Ritz, ML Gross 2006. Podocyte damage is attenuated after sympathetic denervation plus ACEinhibition in rats with renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant* 21
131. Crowley SD, Coffman TM. 2008. In hypertension, the kidney breaks your heart. *Curr Cardiol Rep* 10:470-6
132. Chen W, Frangogiannis NG. 2010. The role of inflammatory and fibrogenic pathways in heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev* 15:415-22
133. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. 2011. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51:600-6
134. Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. 2012. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 10:15-26
135. K Sharma AC, M Smith, C Valancius, EW. Inscho 2005. TGF- β impairs renal autoregulation via generation of ROS *Am J Physiol Renal Physiol* 288:1069-77
136. Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, et al. 2010. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 21:93-102
137. Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P. 1988. Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1105-8
138. Igotz RA, Endo T, Massague J. 1987. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 262:6443-6
139. Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. 2007. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cell tiss org* 185:146-56

140. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, et al. 2005. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation* 111:435-41
141. Langlois D, Hneino M, Bouazza L, Parlakian A, Sasaki T, et al. 2010. Conditional inactivation of TGF-beta type II receptor in smooth muscle cells and epicardium causes lethal aortic and cardiac defects. *Transl Res* 19:1069-82
142. Breckpot J, Budts W, De Zegher F, Vermeesch JR, Devriendt K. 2010. Duplication of the TGFBR1 gene causes features of Loeys-Dietz syndrome. *Eur J Med Genet* 53:408-10
143. Drera B, Tadini G, Barlati S, Colombi M. 2008. Identification of a novel TGFBR1 mutation in a Loeys-Dietz syndrome type II patient with vascular Ehlers-Danlos syndrome phenotype. *Clin genet* 73:290-3
144. Bobik A. 2006. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1712-20
145. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, et al. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2626-31
146. Frutkin AD, Otsuka G, Stempien-Otero A, Sesti C, Du L, et al. 2009. TGF-[beta]1 limits plaque growth, stabilizes plaque structure, and prevents aortic dilation in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1251-7
147. Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, et al. 2011. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 15:607-19
148. Park IH, Park SJ, Cho JS, Moon YM, Kim TH, et al. 2012. Role of reactive oxygen species in transforming growth factor beta1-induced alpha smooth-muscle actin and collagen production in nasal polyp-derived fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 159:278-86
149. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. 2013. TGF-beta signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell signal* 25:264-8
150. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, Oliver PM, Maeda N. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4471-5

151. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55:503-17
152. Mahley RW, Rall SC, Jr. 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:507-37
153. Manneras L, Cajander S, Holmang A, Seleskovic Z, Lystig T, et al. 2007. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 148:3781-91
154. Fassnacht M, Schlenz N, Schneider SB, Wudy SA, Allolio B, Arlt W. 2003. Beyond adrenal and ovarian androgen generation: Increased peripheral 5 alpha-reductase activity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2760-6
155. Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, et al. 2011. Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gend med* 8:103-15
156. Dako. 2006. Pathology *Hercep Test Interpretation Manual*.
157. Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. 2004. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C895-902
158. Carlsson K, Danielsson PE, Lenz R, Liljeborg A, Majlof L, Aslund N. 1985. Three-dimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. *Opt lett* 10:53-5
159. Shotton D, White N. 1989. Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging. *Trends Biochem Sci* 14:435-9
160. Horvath B, Orsy P, Benyo Z. 2005. Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:225-31
161. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. 2008. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47:11-7
162. Mayhew TM. 1991. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp physiol* 76:639-65

163. Gross ML, Ritz E, Korsch M, Adamczak M, Weckbach M, et al. 2005. Effects of estrogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. *Kidney int* 67:849-57
164. Nunnari JJ, Zand T, Joris I, Majno G. 1989. Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Exp Mol Pathol* 51:1-8
165. Buday A, Orsy P, Godo M, Mozes M, Kokeny G, et al. 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:H386-95
166. Koh KK OP, Quon MJ. 2009. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Res.* 81:649-59
167. Mansoor Ahmad. TGF β -1 mediated increase in Nox-4 expression enhances hypoxic pulmonary vasoconstriction in bovine pulmonary arteries. *FASEB J* 22:1174
168. Grainger DJ. 2007. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res* 74:213-22
169. Thannickal V DR, Klinz S, Bastien M, Larios J, and Fanburg B. . 2000. Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-1. *FASEB J* 14:1741-8.
170. Sancho P, Bertran E, Caja L, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Fabregat I. 2009. The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF-beta-induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1793:253-63
171. H. Cai KKGaDGH. 2003. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. . *Trends Pharmacol. Sci.* 24:471-8.
172. Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler HJ, Morawietz H. 2009. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*
173. Ishihara Y, Sekine M, Hatano A, Shimamoto N. 2008. Sustained contraction and endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull* 31:1667-72

174. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, et al. 1989. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 159:1435-40
175. Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuselner C, Kilter H, et al. 2002. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1253-62
176. Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, et al. 2005. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 16:133-43
177. Li J, Qu X, Bertram JF. 2009. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol* 175:1380-8
178. Csiszar A, Toth J, Peti-Peterdi J, Ungvari Z. 2007. The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation. *Acta Physiol Hung* 94:107-15
179. Bujak M, Frangogiannis NG. 2007. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 74:184-95
180. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, et al. 2003. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 41:2164-71
181. Li S, Li X, Zheng H, Xie B, Bidasee KR, Rozanski GJ. 2008. Pro-oxidant effect of transforming growth factor- beta1 mediates contractile dysfunction in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 77:107-17
182. Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ. 2008. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. *J Mol Cell Cardiol* 44:527-38
183. Pintavorn P, Ballermann BJ. 1997. TGF-beta and the endothelium during immune injury. *Kidney int* 51:1401-12
184. Branton MH, Kopp JB. 1999. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* 1:1349-65
185. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. 1993. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91:2268-74

186. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. 2007. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74:196-206
187. Menke A GI, Giehl K, Vogelmann R, Reinshagen M, Adler G. 1999. Transforming growth factor- β -induced upregulation of transforming growth factor- β receptor expression in pancreatic regeneration. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res.* 1449:178-85.
188. Edlin RS, Tsai S, Yamanouchi D, Wang C, Liu B, Kent KC. 2009. Characterization of primary and restenotic atherosclerotic plaque from the superficial femoral artery: Potential role of Smad3 in regulation of SMC proliferation. *J Vasc Surg* 49:1289-95
189. Torun D OR, Turan I, Micozkadioglu H, Sezer S, Ozdemir FN. 2007. The relationship between obesity and transforming growth factor beta on renal damage in essential hypertension. . *Int Heart J.* 48:733-41.
190. Yener S, Demir T, Akinci B, Bayraktar F, Kebapcilar L, et al. 2007. Transforming growth factor-beta 1 levels in women with prior history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 76:193-8
191. Tan BK, Chen J, Digby JE, Keay SD, Kennedy CR, Randeve HS. 2006. Upregulation of adiponectin receptor 1 and 2 mRNA and protein in adipose tissue and adipocytes in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 49:2723-8
192. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, et al. 2012. Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertil steril* 97:462-8
193. Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. 2006. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci* 111:265-74
194. Masszi G NA, Tarszabo R, Horvath EM, Buday A, Ruisanchez E, Tokes AM, Sara L, Benko R, Nadasy GYL, Revesz Cs, Hamar P, Benyó Z, Varbiro Sz 2013. Effects of vitamin D3 derivate calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model. *Pharmacological Reports* 65 in press
195. Gericke A, Sniatecki JJ, Mayer VG, Goloborodko E, Patzak A, et al. 2011. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1602-8

196. 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:H578-85
197. Montano LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquia M. 2008. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology* 149:2517-26
198. Castillo C, Castillo EF, Lopez J, Lopez RM. 2006. [Testosterone inhibits the contractile responses to phenylephrine associated with the release of intracellular calcium in rat aorta]. *Gac Med Mex* 142:1-8
199. Miller KK, Biller BM, Schaub A, Pulaski-Liebert K, Bradwin G, et al. 2007. Effects of testosterone therapy on cardiovascular risk markers in androgen-deficient women with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2474-9
200. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Piperi C, Protogerou A, Katsikis I, et al. 2006. Inflammatory and endothelial markers in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Clin Invest* 36:691-7
201. Schulman IH, Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. 2007. Dissociation between metabolic and vascular insulin resistance in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H853-9
202. 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:E201-8
203. Zeng G, Quon MJ. 1996. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98:894-8
204. 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* 94:2511-5
205. 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

206. Tack CJ, Lutterman JA, Vervoort G, Thien T, Smits P. 1996. Activation of the sodium-potassium pump contributes to insulin-induced vasodilation in humans. *Hypertension* 28:426-32
207. Ngo DT, Chan WP, Rajendran S, Heresztyn T, Amarasekera A, et al. 2011. Determinants of insulin responsiveness in young women: Impact of polycystic ovarian syndrome, nitric oxide, and vitamin D. *Nitric oxide* 25:326-30
208. Yiu YF, Chan YH, Yiu KH, Siu CW, Li SW, et al. 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:E830-5
209. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. 2009. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 202:330-44
210. 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
211. Masszi G, Buday A, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, et al. 2012. Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome. *Fertil steril* 12: pp. S0015-0282

12 Saját irodalom

Buday A, Orsy P, Godo M, Mozes M, Kokeny G, Lacza Z, Koller A, Ungvari Z, Gross ML, Benyo 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:(2) pp. H386-H395. (IF: 3.880)

Masszi G*, Buday A*, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, Sara L, Revesz C, Benko R, Nadasy GL, Benyo Z, Hamar P, Varbiro S (* megosztott elsőszerzők) 2012. Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome.

Fertil Steril 12: pp. S0015-0282. (IF: 3.775)

Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GL, Varbiro S 2012. Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 97:(2) pp. 462-468. (IF: 3.775)

Masszi G, Novak A, Tarszabo R, Horvath EM, Buday A, Ruisanchez E, Tokes AN, Sara L, Benko R, Nadasy GL, Revesz C, Hamar P, Benyo Z, Varbiro S 2012 (in press) Effects of vitamin D+ derivate calcitriol on pharmacological reactivity of aortic ring sin a rodent PCOS model *Pharmacological Reports* (IF:2.445)

Masszi G, Tarszabo R; Horvath EM; Benko R; Novak A; Buday A; Tokes AM; Sara L; Nadasy GL; Hamar P; Benyó Z; Varbiro Sz. 2012 (in press) Reduced Estradiol-Induced Vasodilatation and Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Activity in the Aortas of Rats with Experimental Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) *Plos One* (IF:4.092)

13 Köszönetnyilvánítás

Ehhez a tanulmányhoz kapcsolódó tudományos munka 2005-re nyúlik vissza. Akkor még TDK-hallgatóként a Kóréletani Intézetben kezdtem kísérletezni. Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani **Dr. Hamar Péternek**, hogy a kezdetektől fogva támogatott a munkámban, átsegített a holtponatokon, és mindig a megfelelő helyre irányított, a további eredmények érdekében.

Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet munkatársainak, **dr. Örsy Petrának**, **dr. Riusanchez Évának**, **Körmöci Évának**, **Balog Ibolyának**, és **Dr. Benyo Zoltán** professzor Úrnak, hogy befogadtak, tanítottak, és bármikor szeretettel és segítséggel láttak viszont laborjaikban.

Köszönettel tartozom **Dr. Maria-Luis Gross**-nak, és a Heidelbergi Pathológia Intézet munkatársainak, hogy vendégül láttak, és hozzájárultak ahhoz, hogy kutatásunk további eredményekkel bővüljön.

Köszönöm **Dr. Várbíró Szabolcsnak**, hogy részt vehettem a témavezetésével zajló 2011-es kísérletsorozatban, melynek köszönhetem, hogy eljutottam ideig.

Köszönöm **Cser Áginak**, hogy mindig számíthattam rá, továbbá **Dr. Masszi Gabriellának**, **Godó Máriának**, **Kécsán Kamillának**, **Dr. Novák Ágnesnek**, **Tarsabó Róbertnek**, **Dr. Révész Csabának**, **Dr. Sára Leventének**, **Dr. Kökény Gábornak**, **Dr. Nádasy Györgynek**, és a kutatásban résztvevő összes munkatársamnak a munkám során nyújtott személyes segítséget, és közreműködést.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak a türelmet és biztatást, és hogy velem voltak a legnehezebb időkben.