

Ph.D. értekezés

Az ösztrogén és raloxifen közvetítette kardiovaszkuláris protektív mechanizmusok

Pósa Anikó

Témavezetők:

Dr. Varga Csaba
egyetemi docens

Dr. Gyöngyösi Mariann
egyetemi docens

ifj. Dr. László Ferenc
egyetemi tanár

Biológia Doktori Iskola
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2008

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke.....	4
3. Bevezetés.....	7
4. Irodalmi áttekintés.....	8
4.1. Az ösztrogén szerepe a kardiovaszkuláris betegségek nemi dimorfizmusában.....	8
4.2. Szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok (SERM vegyületek).....	10
4.3. Ösztrogénreceptorok (ER) és a SERM vegyületek hatásmechanizmusa.....	11
4.3.1. Eltérő ER-expresszió.....	12
4.3.2. Különböző ER-komformáció.....	12
4.3.3. A koregulátor fehérjék eltérő mennyisége és kapcsolódása az ER-hoz.....	12
4.4. Az ösztrogén sejtregon kívüli hatásai.....	15
4.5. Ösztrogén által aktivált szignalizációs kaszkádok.....	16
4.6. Az E ₂ és a SERM vegyületek hatása a kardiovaszkuláris rizikófaktorokra.....	18
4.7. Hem-oxigenáz és nitrogénmonoxid-szintáz enzimrendszer.....	19
4.8. A paclitaxel és a HO-1-indukció.....	23
4.9. Aginin-vazopresszin (AVP).....	24
5. Célkitűzések.....	26
6. Anyagok és módszerek.....	27
6.1. E ₂ hiány kardiovaszkuláris hatásai.....	27
6.1.1. Vizsgált állatsoportok.....	27
6.1.2. A reprodukív fázis meghatározása Giemsa-festéssel.....	28
6.1.3. A plazma AVP szintjének meghatározása.....	28
6.1.4. Túlélő patkány aortagyűrű-kontrakció mérése.....	29
6.1.5. Fehérjemeghatározás.....	30
6.1.6. HO-aktivitás meghatározása.....	30
6.1.7. HO-1- és HO-2-expresszió meghatározása.....	30
6.1.8. A bazális vérnyomás és az AVP-re adott válasz mérése.....	31
6.1.9. Szívperfúzió mérése Langendorff szerint.....	32
6.1.10. Adrenalin és fentolamin által kiváltott experimentális angina modell.....	32
6.1.11. Vegyszerek.....	32
6.1.12. Statisztikai analízis.....	33
6.2. Kardiovaszkuláris betegségek helyi gyógyszeres kezelése.....	33
6.2.1. A kísérleti állatok előkészítése.....	33
6.2.2. Lokális hatóanyag-bejuttatás.....	34
6.2.3. Paclitaxelkoncentráció meghatározás.....	34
6.2.4. Statisztika.....	35
7. Eredmények.....	36
7.1. Nemi dimorfizmus.....	36
7.1.1. Hím és nőstény patkányok plazma AVP szintje.....	36
7.1.2. AVP által kiváltott aortagyűrű-kontrakció hím és nőstény patkányokban.....	36
7.1.3. Hím és nőstény patkányok bazális vérnyomása.....	37
7.1.4. Szöveti HO-2- és HO-1-expresszió hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában és aortájában.....	37
7.1.5. HO-aktivitás hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában és aortájában.....	40
7.1.6. HO-gátlás hatása hím és nőstény patkányok AVP-re adott vérnyomásválaszára.....	41
7.1.7. HO-gátlás hatása hím és nőstény patkányok szívizkémiaájára (ST depresszió).....	41
7.1.8. HO-gátlás hatása hím és nőstény patkányok AVP-re adott izolált szív perfúzióra.....	42

7.2. Ösztrusz ciklus	44
7.2.1. HO-2- és HO-1-expresszió nőstény patkányok bal szívkamrájában és aorta abdominalisában különböző E ₂ -telítettségi állapotokban	44
7.2.2. HO-aktivitás különböző E ₂ -telítettségi állapotokban levő nőstény patkányok bal szívkamrájában és aorta abdominalisában	46
7.3. Ovariektómia (OVX) és E ₂ - illetve raloxifenkezelés.....	48
7.3.1. Az E ₂ és raloxifen hatása OVX patkányok plazma AVP szintjére	48
7.3.2. Az E ₂ és raloxifen hatása az OVX patkányok AVP-indukálta aortagyűrű-kontrakciójára.....	48
7.3.3. Ösztradiol és raloxifen hatása OVX patkányok bazális vérnyomására.....	49
7.3.4. Raloxifen és ösztradiol hatása a HO-2 és a HO-1 expressziójára OVX patkányok bal szívkamrájában.....	50
7.3.5. Raloxifen és ösztradiol HO-aktivitásra gyakorolt hatása az OVX patkányok bal szívkamrájában és aortájában.....	51
7.3.6. HO-gátlás hatása az AVP-re adott válszként kialakuló vérnyomásra.....	52
7.3.7. HO-gátlás szívviszkémiára gyakorolt hatása	53
7.3.8. HO-gátlás hatása az izolált szív AVP-re adott perfúzióválaszára.....	53
7.4. Paclitaxelkoncentráció sertés koronárában	55
7.4.1. Paclitaxelszint sertés koronária artériájában paclitaxellel bevont Dior-ballonnal történő lokális hatóanyag-bejuttatást követően	55
8. Diskusszió.....	57
9. Következtetések	65
10. Összefoglaló	66
11. Summary	68
12. Köszönetnyilvánítás	70
13. Irodalomjegyzék.....	72

2. Rövidítések jegyzéke

AF-1: Ligandfüggetlen transzaktivációs funkciójú domain

AF-2: Ligandfüggő transzaktivációs funkciójú domain

AVP: Arginin vazopresszin

BMD: Bone Mineral Density

cGMP: Ciklikus guanozin-monofoszfát

CO: Szén-monoxid

DBD: DNS-kötő domain

DTT: Ditiotreitól

E₂: Ösztrogén

EGFR: Epidermális növekedésifaktor-receptor

egr-1: Korai növekedési válasz-1

ER: Ösztrogénreceptor

ERE: Ösztrogénválasz-elem

ERK: Extracellulárisan szabályozott kináz

FSH: Follikulusstimuláló hormon

GPCR: G protein-kötött receptor

Grb: Növekedésifaktor-receptor kötő fehérje

GSH: Glutation

HDL: Magas denzitású lipoprotein

HEPES: N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etánszulfonát

HERS: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study

HO: Hem-oxigenáz

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HSF1: Hősokkfaktor-1

Hsp 90, Hsp70, Hsp32: Hősokkfehérje 90, 70, 32

IGF: Inzulinszerű növekedési faktor

IGFR: Inzulinszerű növekedésifaktor-receptor

IL-1 β : Interleukin-1-béta

IL-6: Interleukin-6

JNK: Jun N-terminális kináz

JNKK: Jun N-terminális kináz (JNK) kináz

K_{Ca}: Kalciumaktivált káliumcsatorna

LAD: Bal oldali anterior leszálló

LBD: Ligandkötő domain

LCx: Bal oldali circumflex

LDL: Alacsony denzitású lipoprotein

LH: Luteinizáló hormon

L-NAME: N(G)-nitro-L-arginin-metilészter

L-NNA: N(omega)-nitro-L-arginin

Lp a: Lipoprotein a

MAPK: Mitogénaktivált protein kináz

MEK: Mitogénaktivált extracellulárisan szabályozott kináz (ERK) kináz

MIP 1 α : Makrofág gyulladásos fehérje-1-alfa

MORE: Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation

MPA: Medroxioprogesteron-acetát

NADPH: Redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

β -NADPH: β -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NO: Nitrogén-monoxid

NOS: Nitrogénmonoxid-szintáz

cNOS, eNOS, iNOS, nNOS: Konstitutív, Endoteliális, Neuronális, Indukálható nitrogénmonoxid-szintáz

O²⁻: Szuperoxid-anion

OVX: Ovariectómia

PDGF: Vérlemezke-eredetű növekedési faktor

P3K: Foszfatidil-inozitol-3' kináz

PK: Protein kináz

PMSF: Fenil-metil-szulfonil-fluorid

R: Raloxifen

R 0,11: 0,11 mg/kg koncentrációjú raloxifen

R 0,33: 0,33 mg/kg koncentrációjú raloxifen

R 1,0: 1,0 mg/kg koncentrációjú raloxifen

RCA: Jobb oldali koronária artéria

RIA: Radio Immuno Assay

ROS: Reaktív oxigéngyökök

RUTH: Raloxifene Use for the Heart

SERM: Szelektív ösztrogénreceptor-modulátor

sGC: Oldható guanilát-cikláz

SnPP: Ón-protoporfirin IX

Sos: 'Son of sevenless'

Src: Nem receptor tirozin kináz

SRE: Szérumválaszelem

SRF: Szérumválaszfaktor

TAF: Transzkripcióaktiváló funkció

TNF, TNF α : Tumornekrózis-faktor, Tumornekrózis-faktor-alfa

VSMC: Vaszkuláris simaizomsejt

WHI: Women's Health Initiative

ZnPP-IX: Cink-protoporfirin IX

3. Bevezetés

A várható élettartam fokozatos kitolódásával az egészségügy számára az egyik legnagyobb kihívást az időskorú emberek betegségeinek ellátása jelenti. Mintegy száz évvel ezelőtt a fejlett ipari országokban a nők átlagos élettartama 50 év körül volt, szemben a jelenlegi 75-80 évvel. Ez azt jelenti, hogy – mivel a menopauza ideje körülbelül az 50 éves kor idejére esik – korábban a nők gyakorlatilag nem éltek meg a posztmenopauzát, illetve annak következményeit. Ezzel szemben ma egy nő átlagosan életének mintegy egyharmadát éli le ösztrogénhiányos állapotban. E tényekből adódik, hogy a menopauza utáni szexuálszteroid-hiányállapot morbiditásra és mortalitásra gyakorolt hatásai az elmúlt évtizedekben kerültek a kutatás előterébe.

A posztmenopauzális hormonpótló kezelést kezdetben a szubjektív peri- és posztmenopauzális panaszok enyhítésére vezették be. Később igazolódott, hogy az ösztrogén- illetve progeszteronpótlás hatékony védelmet jelenthet az oszteoporózis kialakulása ellen is. A hormonpótló kezelés összpopulációs halálozásra gyakorolt egyik legjelentősebb hatása, a kardiovaszkuláris betegségek incidenciájának befolyásolása mintegy 20 éve áll intenzív kutatás alatt.

Észak-Amerikában és Európában egyértelműen a szív-érrendszeri megbetegedések jelentik a vezető halálokat. Az értekezés szempontjából kitüntetett szubpopuláció, a posztmenopauzális korú női lakosság mortalitásában az Egyesült Államokban kb. 45 %-os arányban van jelen a kardiovaszkuláris halálozás [1]. Sajnálatos, hogy Magyarországon e tekintetben sokkal súlyosabb a helyzet, a klimaktérium utáni magyar női lakosság 56 %-a hal meg szív-érrendszeri okok következtében. Ezen túlmenően, míg a női szív-érrendszeri halálozás Nyugat-Európában és az Egyesült Államokban csökkenő tendenciát mutat, Magyarországon éppen ellenkező irányú trend figyelhető meg [2].

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az ösztrogén szerepe a kardiovaszkuláris betegségek nemi dimorfizmusában

A reprodukív időszak alatt a kardiovaszkuláris betegségek előfordulásának valószínűsége alacsonyabb nőkben, mint férfiakban. A klinikumban jól ismert, hogy 60 év alatti nők esetében nem alakul ki gyakran miokardiális infarktus és stroke. A természetes vagy bilaterális ovariektómiából adódó mesterséges menopauzát követően ösztrogénkezelés hiányában viszont kétszer nagyobb a koronáriát érintő szívbetegségek kialakulásának veszélye, mint azokban a nőkben, akik ösztrogénkezelésben részesültek [3]. Mivel a szív-érrendszeri megbetegedések incidenciájának növekedése szoros összefüggést mutat a menopauza után eltelt idővel, így feltételezhető volt, hogy a női szexuálissteroidok szérum szintjének csökkenése növeli a kardiovaszkuláris rizikót. Megállapították azt is, hogy normotóniás és hypertóniás egyéneknél a kor előrehaladtával az endotélfüggő vazodilatáció fokozatos csökkenése jelenik meg mindkét nemből. A nőknél azonban ez a progresszív csökkenés az ötvenes életkorszakaszig sokkal lassabb ütemű, mint férfiak esetében. Menopauzában viszont az endotél funkciója meredeken romlani kezd: a 60 éves kor feletti nők endotélfüggő vazodilatációja eléri a férfiaknál észlelt szintet [4]. Ma már jól ismert, hogy az érendotél csökkent vazodilatatív funkciója, a hypertonia, a hyperkoleszterinémia és az ateroszklerózis között szoros kapcsolat van, amely fokozott kardiovaszkuláris kockázathoz vezet. Menopauzában tehát az emelkedő szív- és érrendszeri betegségekből adódó halálozás hátterében az ösztrogénhiány következményeként kialakuló érendotél-diszfunkció fontos szerepet tölthet be. Mindezek alapján kézenfekvőnek tűnik, hogy menopauzában a hormonpótló terápia csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedések előfordulási gyakoriságát [5-7]. Az endometrium hiperplázia és karcinóma kialakulásának kockázatát csökkentendő [8] a hormonpótló kezelés során ma a legtöbb esetben kombinált ösztrogén-progeszterogén-kezelést alkalmaznak. A progeszteronszármazékokról azonban leírták, hogy az ösztrogén kedvező lipidhatásait ronthatják (például az ösztrogén monoterápia által kiváltott HDL-koleszterinszint-emelkedést mérsékelve), antiateroszklerotikus, illetve közvetlen vazodilatatív hatását is gátolhatják [8-15]. Ezért felmerült, hogy az ösztrogénpótló kezelés progeszterogénnel történő szükségszerű kiegészítése a hormonpótló kezelés szív és érrendszeri védőhatását ronthatja, bár az epidemiológiai adatok arra utalnak, hogy a kombinált kezelés kardiovaszkuláris szempontból még előnyösebb is lehet, mint az ösztrogén-monoterápia [16]. A

progeszteronszármazékok erekre gyakorolt hatásaira vonatkozólag jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre az irodalomban, mint az ösztrogénkezelés esetében. Ez igaz mind a metabolikus, mind a direkt érfali hatások tekintetében. A progeszteronszármazékok közül a világon legelterjedtebben használt medroxiprogeszteron acetát (MPA).

A várakozásokkal ellentétben azonban olyan jól ismert, széleskörű randomizált klinikai vizsgálatok, mint a Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) és a Women's Health Initiative (WHI) nem igazolták a hormonpótlás kedvező hatását menopauzában. Azt tapasztalták, hogy a hormonpótlás nem befolyásolta a koronáriabetegség progresszióját, illetve nem csökkentette a kardiovaszkuláris események kockázatát [17, 18].

A HERS vizsgálat az ösztrogénpótlás szekunder preventív hatását elemezte, amelyben több mint 2500 menopauzában lévő nő 4 éven keresztül konjugált ösztrogént és MPA-ot vagy csak placebo-t szedett. Meglepetésre a hormonpótló kezelés nem vezetett sem a nem fatális infarktusok, sem a koronáriaeredetű mortalitás csökkenéséhez. Az egyébként gondosan tervezett vizsgálatot azonban megjelenése óta számos kritika érte. A két legfőbb problémát a rövid követési idő jelentette, illetve az, hogy a tanulmányba csak olyan nőket vontak be, akiknél már igazolt koronária betegség állt fenn, valamint életkoruk 65-70 év között volt, így az eredmények csak az úgynevezett szekunder prevencióra vonatkoznak.

A WHI tanulmány fő célja a koronária megbetegedések primer prevenciójának vizsgálata volt. A tanulmányba 16600 menopauzában lévő, intakt uteruszal rendelkező, egészséges nőt vontak be. A besorolást követően a nők egyik csoportja a HERS-hez hasonlóan konjugált ösztrogén és MPA kezelésben részesült, míg a másik csoport placebo-t kapott. A vizsgálat befejezését 2005-re tervezték, amely 8,5 év nyomon követési időszakra felelt meg. A WHI tanulmányt azonban átlagosan 5,2 éves követés után idő előtt felfüggesztették. Az addig eltelt időszak alatt ugyanis a hormonpótlásban részesülők körében a placebo csoporthoz viszonyítva szignifikánsan megnőtt a szívinfarktus (29 %), a stroke (41 %), a thromboemboliás események (111 %) és a szív- és érrendszeri történések összes (22 %) gyakorisága. Az eredmények abszolút kockázatát figyelembe véve ez azt jelenti, hogy 10000 nő közül évente 7-tel több szívinfarktus (30 helyett 37) és 8-al több stroke (21 helyett 29) jelentkezett [19]. A vizsgálatokban azt tapasztalták, hogy a hormonpótlásra kijelölt nők körében a kezelés hatására a kardiovaszkuláris mortalitás szignifikánsan megnőtt a terápia első évében.

4.2. Szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok (SERM vegyületek)

Az ösztrogénpótlásnak számos egyéb jótékony hatása is van, mint például a csontállomány megőrzése és az Alzheimer-kór kialakulási valószínűségének csökkentése [20]. Viszont a hosszú távú ösztrogénkezelés növeli az emlő- és endometrium karcinómák kialakulásának kockázatát [21, 22]. Ezért nagyszabású kutatómunka kezdődött annak érdekében, hogy olyan új vegyületeket találjanak, amelyek rendelkeznek az ösztrogén jótékony tulajdonságaival, viszont nem szerepelnek a rákos megbetegedések rizikófaktoraként.

A szelektív ösztrogénreceptor-moduláció modern elképzelése ígéretes, mivel olyan hatóanyagok tervezése válik lehetővé, amelyek megőrzik ösztrogénagonista hatásukat a célzott szövetekben, mint a csontok, a keringési rendszer vagy a központi idegrendszer, de nem stimulálnak olyan szöveteket, mint az endometrium vagy az emlők, ahol az ösztrogének onkogénhatásúak lehetnek. Mivel ezen vegyületek ösztrogénagonista és –antagonista hatása is az ösztrogénreceptorokon (ER) keresztül érvényesül, az ilyen szövetspecifikus tulajdonságú anyagokat SERM vegyületeknek nevezték el [23]. Az utóbbi évek farmakológiai kutatásai eredményeként számos hatóanyag került be a SERM vegyületek csoportjába.

A tamoxifen volt az első hatóanyag, aminek posztmenopauzás nők csontásványianyag tartalmára (Bone Mineral Density- BMD) és szérumlipidjeire gyakorolt jótékony hatását bizonyították [24], ezen túl hatékonyak mutatkoztak az előrehaladott állapotú mellrák kezelésében is [25]. Sajnálatos módon az endometriumra kifejtett hatása vitatott, mivel több megfigyelés tulajdonít neki onkogén, ösztrogénszerű hatást [26].

A további szelektív vegyület után történő kutatás vezetett el a raloxifen kifejlesztéséhez, ami egy nem szteroidtermészetű benzotiofén vegyület, és hatását tekintve az emlőkben és a méhben ösztrogénantagonista, míg a csontokban és a kardiovaszkuláris rendszerben –agonistaként viselkedik [27-32]. A raloxifent évek óta alkalmazzák az oszteoporózis gyógyítására és profilaxisára posztmenopauzás nőkben.

A tamoxifenről leírták, hogy védőhatást gyakorolnak a hím állatok csontjaira [33-36], valamint hím és ovariectomizált nőtény patkányok megnövekedett csontmineralizációján keresztül a raloxifen vázrendszerre kifejtett pozitív hatását is bizonyították (kialakuló ösztrogénhiány-indukálta osteopenia) [37].

Ovariectomizált patkányokon végzett kísérletekben a raloxifenkezelés az uterusz epiteliális sejteinek magassága, a miometrium vastagsága és a sztrómaexpánzió vonatkozásában hasonló eredményt hozott, mint a kezeltlen intakt nőtény állatok esetében [23, 27].

Két 1997-ben közölt tanulmány szerint a raloxifen nem rendelkezik endometriális aktivitással posztmenopauzális nőkben. 208 posztmenopauzális nő bevonásával végzett kísérletben a raloxifen hatását 0,625 mg/nap dózissal, konjugált ösztrogénnel és placeboval hasonlították össze. Míg az ösztrogénkezelésen átesett nők 77 %-ának és a placebokezeltek 15 %-ának endometrium-biopsziája mutatott ki szignifikáns ösztrogénhatást, a raloxifenel kezelt nők egyikénél sem változott az endometrium [38]. A második tanulmány 444 európai nő részvételével zajlott, akiket transzvaginális ultrasonográfiával vizsgáltak, legalább egyszer egy 24 hónapos raloxifen- vagy placebokezelés után. Nem mutattak ki különbséget a két csoport között endometrium-vastagság vonatkozásban [30].

1999-ben, 3 éves kutatás után közzétették a Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) vizsgálat eredményeit. A kettősvak, placebokontrollált vizsgálatban 7705 nőt kezeltek raloxifennel vagy placeboval, és az eredmények szintén megerősítik, hogy a raloxifen nem növeli az az endometrium karcinóma kockázatát, mi több, az endometriális biopszián átesettek eredményei alapján az endometriális hiperpláziát sem [39].

A raloxifen az uterusz szövetére gyakorolt hatásában különbözik a tamoxifentől. A tamoxifen sajátos stimuláló hatásával szemben a raloxifenről kísérleti és klinikai adatok bizonyítják, hogy nem befolyásolja sem az endometriumot, sem a miometriumot.

Nyilvánvaló a különbség trifenil-etilén- (tamoxifen) és a benzotiofén-származékok (raloxifen) molekulaszervezete között, ami a ligand-receptor komplex eltérő konformációváltozását feltételezi, mikor a két vegyület ösztrogén receptorhoz (ER) köt.

4.3. Ösztrogénreceptorok (ER) és a SERM vegyületek hatásmechanizmusa

A SERM vegyületek szerkezeti alapja az ösztrogének szteroidstruktúrája, amelyek harmadlagos szerkezetükkel az ER-okhoz képesek kötődni. Ezen vegyületek számos tagja már évtizedek óta ismert, a szövetspecifikus hatásmechanizmusukat mégis csak nemrég sikerült tisztázni. Az ösztrogének hatásmechanizmusának klasszikus modellje alapján a szabad ER a célsejt magjában inaktív formában helyezkedik el. Egy agonista, mint pl. az ösztradiol kapcsolódása megváltoztatja az ER fizikokémiai tulajdonságait, amelyen keresztül lehetővé válik, hogy a receptordimer interakcióba lépjen egy specifikus ER-specifikus DNS-szakasszal [40]. A meghatározott DNS-régió és az ER összekapcsolódása serkentő vagy gátló hatással van az adott génszakasz transzkripciójára. A SERM vegyületek szövetspecifikus, kevert agonista és antagonisták hatása azonban arra a felismerésre vezetett, hogy ezen klasszikus modell nem

egészen teljes, és az ösztrogének hatásmechanizmusa sokkal összetettebb, mint ahogy azt korábban feltételezték [41, 42]. Habár a SERM-ek hatásmechanizmusa még csak részben ismert, fokozatosan világossá vált, hogy ezen kivételes vegyületek hatása három útvonalon keresztül valósulhat meg:

4.3.1. Eltérő ER-expresszió

A célsejtekben eltérő koncentrációban található meg az ER két izoformája – ösztrogénreceptor α (ER α) és β (ER β) – által alkotott homodimerek, valamint az ER α és ER β által képzett heterodimer. Genetikailag módosított ER α - vagy ER β -hiányos egereket vizsgálva kimutatták, hogy a két receptor egymástól eltérő hatással rendelkezik [43, 44]. Az ER α többnyire aktivátorként működik, viszont az ER β gátolhatja az ER α hatását, amennyiben heterodimert alkot vele. Továbbá microarray-analízissel kimutatták, hogy egerekben az ER β 46 %-kal gátolja mintegy 240 ösztrogénérzékeny gén transzkripcióját [45]. Ezen két receptor-izoforma mennyisége határozza meg a sejt ösztrogénérzékenységét [46, 47]. A raloxifen mindkét receptorhoz képes kapcsolódni, így antagonistát hatást fejt ki, ha ER β -hoz kötődik, de parciális agonistaként viselkedik az ER α -án keresztül [46].

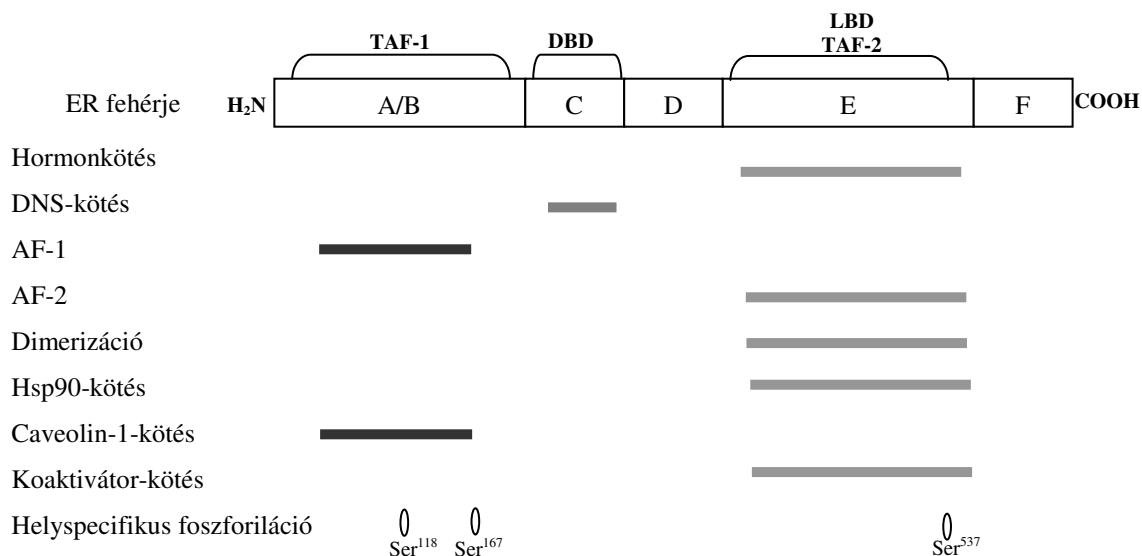
4.3.2. Különböző ER-konformáció

Fehérje-krisztallográfiával kimutatták, hogy mind az ösztradiol, mind a SERM vegyületek, mint pl. a tamoxifen és a raloxifen, az ER egyedülálló konformációváltozását okozzák a receptor-ligand kapcsolódást követően [48-50].

4.3.3. A koregulátor fehérjék eltérő mennyisége és kapcsolódása az ER-hoz

Már több mint 20 koregulátor fehérjét ismernek, melyek az ER-hoz kapcsolódva befolyásolják annak funkcióját. Ezen anyagok serkentik (koaktivátor) vagy gátolják (korepresszor) a transzkripció folyamatát [51-54]. A receptor-ligand kapcsolódás következtében kialakult konformációtól függően az ER-hoz a koregulátor fehérjék igen változatos kombinációi kötődhetnek, és ennek hatására különböző módon fejthetik ki a hatásukat. A koregulátor fehérjék

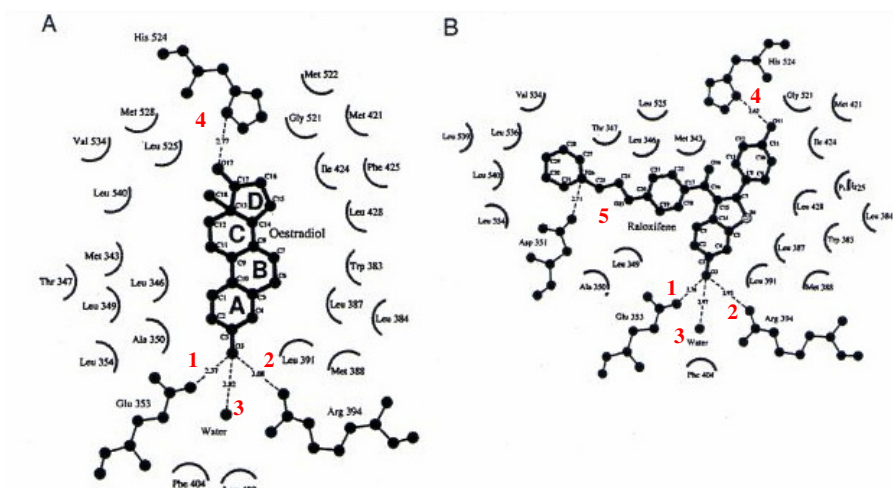
expressziójának szintje igen eltérő az ösztrogénérzékeny sejtekben [52]. Kimutatták, hogy a tamoxifen és a raloxifen, melyek az emlőkben antagonistaként viselkednek, az emlőszövet sejtjeiben a korepresszor fehérjék szintjét növelik. Ezzel ellentétben a tamoxifen méhben parciális agonistaként hat, és a koaktivátorok mennyiségét növelve endometrium hyperplasiát okoz, szemben a raloxifennel, amely semleges hatással van a méhre [55]. Az ER 8 exon által kódolt 6 funkcionális domainből áll (1. ábra). Az A/B domain, amit regulátor domainnek is hívnak, magában foglalja a transzkripcióaktiváló funkció-1-et (TAF-1), ami az agonista kötődése hiányában is képes stimulálni a transzkripciót. A C régió tartalmazza a DNS-kötő domaint (DBD), ami lényegében 2 zinc finger motívumból tevődik össze. A csuklónak is nevezett D régió a rotáció helyszíne, míg az E régió tartalmazza a ligandkötő domaint (LBD). Az E régió része még a transzkripcióaktiváló funkció-2 (TAF-2), a dimerizációs domain és egy 90-es hőszokkfehérje- (Hsp 90) kötő funkció. Végül az F régió vagy C terminális szegmens feltételezhetően a transzkripció modulálásában játszik szerepet az agonistákkal és antagonistákkal együttműködve. A TAF-1-gyel ellentétben, ami konstitutívan aktív, a TAF-2-t a ligand receptorhoz kötődése aktiválja.



1. ábra: Az ER α funkcionális régiói

Az ER 8 exonról átírt 6 funkcionális domainből áll. Ezek tartalmaznak egy ligandfüggetlen transzaktivációs funkciójú (AF-1), egy DNS-kötő, egy hormonkötő, és egy ligandfüggő transzaktivációs funkciójú domaint (AF-2). A más fehérjékkel történő interakció, valamint a különböző kinázok által történő foszforiláció feltételezett helyei szintén láthatók.

A trifenil-etilén- és benzotiofén-családok tagjai az ER LBD domainjéhez kötnek. A kötőhelyhez csatlakozva az ösztradiol az A-gyűrűjén át közvetlen H-hidat létesít a 353-as pozíciójú glutaminsav karboxil- (1), a 394-es arginin guanidincsoportjával (2), és egy vízmolekulával (3), valamint a D-gyűrűjén keresztül az 524-es pozícióban található hisztidinnel(4). A raloxifen az ösztradiolhoz hasonlóan szintén az említett 3 aminosavhoz kötődik közvetlen H-kötéssel, de kapcsolatot létesít a 351-es pozícióban levő aszparaginsavval (5) is (2. A, B ábra) [56].



2. ábra: Az ösztradiol és a raloxifen kötődése az ER-hoz

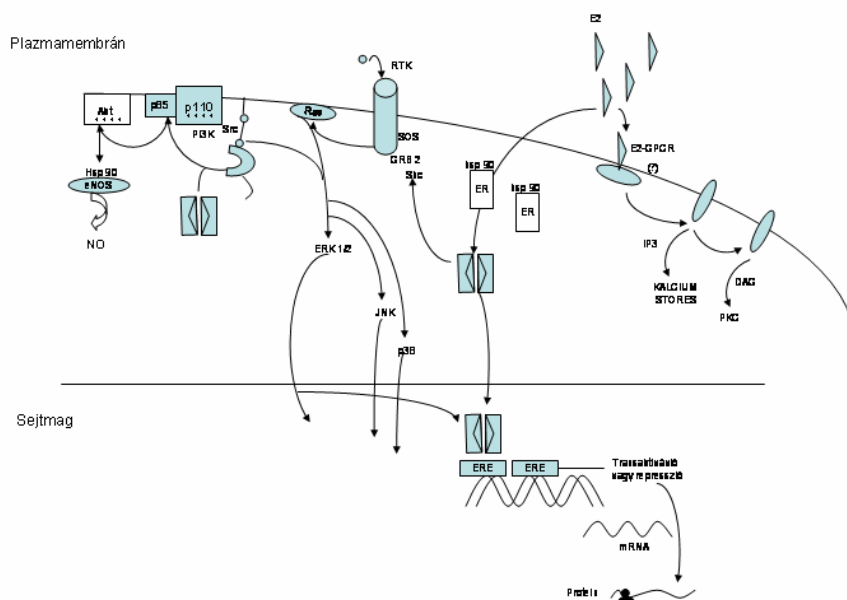
Az ösztradiol (A) és a raloxifen (B) megfelelő aminosavakkal történő interakciójának részletes bemutatása az ER ligandkötő helyén

A raloxifen kötőhelyen történő végleges elhelyezkedését az ER 12-es hélixszerkezetű oldallánca határozza meg. Az ösztradiol LBD-be történő inszerciójának következményeképp az ER nagy 12-es hélice a szteroidmolekula köré tekeredik, így szabaddá válik 3, az 540-es, 543-es és 547-es pozícióban található specifikus aminosav, amelyek a koaktivátorok megkötéséért felelősek a TAF-2 régióban [57]. A raloxifen esetében a 12-es hélix reorientálódik, így nem képes a ligandot tartalmazó kötőhely lezárására [58]. A megváltozott helyzetű TAF-2 régió gátolja a koaktivátorok segítségével kialakuló transzkripciós komplex létrejöttét, így a szignál transzdukció megszakad. A tamoxifen a raloxifenhez hasonlóan TAF-2 antagonistaként viselkedik az uterusban, ami a raloxifen hatásával ellentétes. Valószínűsíthető, hogy az endometriumban a két vegyület által kiváltott ellenkező hatás a TAF-2-ben vagy más domainben a ligand-receptor komplex által indukált változások következménye. Kristallográfias vizsgálatokkal bizonyították, hogy a raloxifen antiösztrogén-hatása az alkilaminoetoxi oldallánc és a 351-es pozícióban található aszparaginsav interakciójából adódik.

Az endometriális aktivitás hiányáért a raloxifenmolekula ezen oldalláncának speciális elhelyezkedését, mint az antiösztrogén tulajdonságok meghatározóját tartják felelősnek [59].

4.4. Az ösztrogén sejtmagon kívüli hatásai

A transzkripciófüggő ösztrogénhatások, mint azok is, amelyek az organogenezisben és a szaporítószerv-rendszer működésében játszanak szerepet, órákkal a stimulus után jelentkeznek. Ezekkel szemben a sejtmagon kívüli, más néven nem-transzkripció vagy nem-genomi ösztrogénhatások számos sejttypusban már néhány perccel a stimulust követően kimutathatók. További jellemzők a transzkripció vagy a fehérjeszintézis inhibitoraival (aktinomycin D vagy cikloheximid) szembeni rezisztencia, és a membránban vagy a citoszolban található szignalizációs komponensek mennyiségének növelése. Ilyenek például a másodlagos hírvivőként funkcionáló kalcium és nitrogén-monoxid (NO); receptor tirozin kinázok, többek között az epidermális növekedésifaktor-receptor (EGFR), az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) és receptora (IGF1R), a G protein-kapcsolt receptorok (GPCR) és protein kinázok, mint a foszfatidilinozitol-3' kináz (PI3K), a szerin-treonin kináz Akt, a mitogénaktivált protein kináz (MAPK) család tagjai, a nem-receptor tirozin kináz Src, továbbá a protein kináz A és C (PKA és PKC) (3. ábra) [60-62].



3. ábra: Az ERα néhány sejtmagi és magon kívüli funkciója

Rövidítések: endoteliális nitrogénmonoxid-szintáz (eNOS), nitrogén-monoxid (NO), 90-es hőszokkfehérje (hsp90), foszfatidil-inozitol-3' kináz (PI3K), son of sevenless (Sos), növekedésifaktor-receptor kötő fehérje 2 (Grb2), G protein-kapcsolt receptor (GPCR), protein kináz A (PKA), protein kináz C (PKC), extracellulárisan szabályzott kináz 1 és 2 (ERK1/2), Jun N-terminális kináz (JNK), a MAPK 38-kDa-os izoformája (p38), ösztrogénválasz-elem (ERE).

4.5. Ösztrogén által aktivált szignalizációs kaszkádok

A PI3K-Akt szignalizációs kaszkád a sejttagon kívüli ösztrogénszignalizáció egyik célpontja. Az érrendszerben a rövid idejű ösztrogén (E_2) –kitettség NO-függő vazodilatációt eredményez. Az egészséges véredények által szekretált NO simaizom-relaxációt, valamint trombocitaaktiváció gátlást okoz ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP)-függő mechanizmuson keresztül. Endotélsejt-tenyészetben az E_2 néhány perc alatt megemeli a NO-felszabadulás mértékét anélkül, hogy az endoteliális nitrogénmonoxid-szintáz (eNOS) expressziója megváltozna. Az E_2 két fázisban, MAPK és PI3K-Akt útvonalakon keresztül emeli meg az eNOS aktivitását, ami megnövekedett NO-felszabadulást eredményez. Az ischemia-reperfüzió alatti, nagy dózisú kortikoszteroidokkal történő miokardiális védelem szintén a PI3K-Akt által mediált folyamat. Mindkét esetben az ER glükokortikoid-receptorok aktiválják a PI3K-t egy ligandfüggő mechanizmussal azáltal, hogy kapcsolatot létesítenek a p85 szabályozó alegységgel. Ezen túl a 90-kDa hő sokkfehérje (Hsp90) interakcióba lép mind az eNOS-zal, mind az Akt-tal, és azáltal modulálja az eNOS aktivitást, hogy scaffoldként viselkedik az enzim Akt-függő foszforilációjának szabályozásában.

A MAPK család tagjai közismert célpontjai a sejttagon kívüli E_2 -szignalizációnak. A MAPK inhibitor PD98059 gátolja szívizomsejtekben az eNOS indukcióját és az indukálható NOS (iNOS) expresszióját. Ez a klinikum szempontjából fontos lehet, mivel a NO gátolja a kaszpázok aktivációját. Az E_2 szintén aktiválja az extracellulárisan szabályozott 1-es és 2-es típusú kinázokat (ERK1/2) szívizomsejtekben, vastagbél- és mellrák esetében, valamint csontokban, viszont vaszkuláris simaizomsejtekben (VSMC) és a tüdő miofibroblasztjaiban gátlólag hat rájuk. A szívben az ER szelektíven aktiválja a MAPK 38 kDa-os izoformáját (p38), így modulálja a hipertrófia kialakulását. Endoteliális sejtekben az E_2 meggátolja az aktin citoszkeleton iszkémia alatti degradációját, a sejthalált, és elősegíti a sérülésfüggő angiogenezist azáltal, hogy gyorsan és szelektíven aktiválja a p38 antiapoptotikus β izoformáját (p38 β), és gátolja a proapoptotikus p38-at, ami a MAPK-aktivált protein kináz-2 (MAPKAP-2) megnövekedett expresszióját és a Hsp27 foszforilációját eredményezi. A downstream hatások közé tartozik a stress fiber-képződés és a membránintegritás fenntartása, a hipoxia-indukált apoptózis megelőzése, valamint az endoteliális sejtek migrációjának és a kezdetleges kapilláriscsövek kialakulásának indukálása. Az ER valószínűleg irányítja több plazmamembránban lokalizált receptor-proximális szignalizációs komplex aktivációját. Ha a sejtekben túltermelődik, a ligandot kötött ER indukálja az IGF1R gyors foszforilációját és az ERK1/2 aktivációját. Mivel ezek a receptorok ligandfüggő módon koimmunoprecipitálódnak, az

ER és az IGF1R közti közvetlen fizikaikapsolat vélhetően képes mediálni az ERK1/2 aktivációját. Mellrák-sejtvonalakban a ligandot kötött ER elősegíti az Src és Shc fehérjék gyors foszforilációját, ami a Shc-Grb2 (növekedésifaktor-receptor kötő fehérje 2)-Sos (son of sevenless) komplex képződését eredményezi, és ez a Ras, Raf, és MAPK downstream aktivációjához vezet. Hasonlóképpen, az E₂-kezelés az ER foszfo-Tyr⁵³⁷ és az Src SH2 (Src homology 2) domain asszociációját indukálja mellrák- és prosztaták-sejtekben, ami az Src-Ras-ERK útvonal indukációjához és a sejtciklus előrehaladásához vezet. Ezen túl mellráksejtekben az Src egy reverzibilis crosstalk-mechanizmuson keresztül modulálja a PI3K-Akt szignalizációját, ami által a ligandot kötött ER a PI3K-val és az Src-vel egy hármas komplexet alkot.

A sejtmagon kívüli szignalizáció képes az ER sejtmagi, transzkripcionális aktivitásának növelésére is. Például laktotróf sejtekben az E₂ gyorsan aktiválja az ERK1/2-t, következésképpen megnö a prolaktin gén transzkripciója, komplementálva a prolaktin transzkripciójának közvetlen, ER általi, ERE-függő aktivációját. A sejtmagon kívüli ER-aktivitás képes az ERE-független transzkripcionális aktiváció kiváltására is. Szívizomsejtekben az E₂ gyorsan megnöveli az early growth response-1 gén (egr-1) ERK1/2-függő expresszióját azáltal, hogy indukálja a szérumválaszfaktor (SRF) szérumválaszelemékké (SREs) történő felépülését az egr-1 promóterben.

Egyes növekedési faktorok, mint az EGF az IGF-1 egy sejtmagon kívüli, E₂-független mechanizmussal képesek stimulálni az ER sejtmagi aktivitását. Molekuláris hálózatok cross-talk-ján keresztül az extracelluláris mitogén szignálok a sejtciklus továbbhaladását, vagy rákos sejtek hormonfüggetlen osztódását eredményezik. A MAP kinázok EGF- és IGF-1-mediálta stimulációja az ER Ser¹¹⁸-jének közvetlen foszforilációját okozza, ami fokozza a p68 RNS-helikáz kötődését, és segíti az AF-1-függő transzkripcionális aktivitást az uterusz és a petefészkek adenokarcinóma sejteiben. Az ERK1/2 szintén képes foszforilálni a sejtmagi koregulátor fehérjéket, ami a transzkripció aktivitás növekedését eredményezi.

Végül az Src fokozhatja az ER AF-1 funkcióját egy Src, Raf-1, mitogénaktivált ERK kináz (MEK) és ERK útvonalon, ami a Ser¹¹⁸ foszforilációját okozza, vagy pedig egy Src-ből, MEK kinázból (MEKK), Jun N-terminális kináz (JNK) kinázból (JNKK) és az AF-1-asszociált koaktivátókat szabályozó JNK-ből álló úton [63].

4.6. Az E₂ és a SERM vegyületek hatása a kardiovaszkuláris rizikófaktorokra

Az E₂ és raloxifen kardiovaszkuláris védőhatása részben azon alapul, hogy kedvezően befolyásolják a szív- és érrendszeri megbetegedésekben szerepet játszó rizikófaktorokat. A kardiovaszkuláris kockázati tényezők tekintetében kimutatták, hogy a raloxifenkezelés mellett jelentkező kedvező hatások hasonlóak, de nem teljesen azonosak az E₂-pótló kezeléshez társuló változásokkal. A különböző mintázatú változás egyrészt megmagyarázhatja az E₂-nel és a raloxifennel kapcsolatos klinikai vizsgálatok eltérő eredményeit.

A raloxifen és az E₂ lipoproteinszintekre gyakorolt kedvező hatása fontos tényező a kardioprotektív mechanizmusok között. A lipoprotein-profil azonban a kardiovaszkuláris változások csak 25-50 %-áért felelős [5]. Az E₂ kedvező hatást gyakorol a lipid-, lipoprotein- és szénhidrát-anyagcserére, csökkenti a szérum össz-koleszterin és az alacsony denzitású lipoprotein (LDL-koleszterin), növeli a nagy denzitású lipoprotein (HDL-koleszterin) szintjét, gátolja az inzulin-rezisztencia és az annak következményeként megjelenő hiperglikémia, illetve hiperinzulinémia kialakulását [64, 65]. Gátolja az érfali lipidperoxidációt és lipoprotein-lerakódást, a trombocitaaggregációt, valamint a miointimális proliferációt [66-71], így végeredményben az arterioszklerotikus folyamat kialakulását [72-77], viszont a triglicerid szérumszintjét növeli. Az LDL-lel szemben a HDL-koleszterin protektív hatást fejt ki az érfal károsodásával szemben. Hormonpótló kezelés alkalmazása után a HDL (ezen belül a leginkább előnyös HDL-2 szubfrakció) szintek emelkedését igazolták a vizsgálatok [31, 78]. A raloxifen szintén csökkenti az LDL-koleszterin szintet, de nem emeli a HDL-koleszterint, továbbá nem fokozza a triglicerid szérumszintjét. Kimutatták, hogy mind az E₂, mind a raloxifenkezelés csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót szintén fokozó lipoprotein(a) szérumszintjét, amely értéke a menopauza után megnő [79]. A lipoprotein(a) emelkedett szintje az arterioszklerózis önálló rizikófaktora, mivel egyrészt fokozza az LDL-koleszterin lerakódását az artériák falában, másrészt gátolja az endotélsejtek felszínén a lokális trombolízist, amivel elősegíti az erekben a plakkok kialakulását [80, 81]. Állatkísérletes modellben megfigyelték, hogy majmokban petefészekirtást követően a koronáriák falában a meszesedés fokozódik, amely az E₂ pótlásával gátolható [82]. További vizsgálatokkal tisztázták, hogy az E₂-pótlás következtében csökken az LDL-koleszterin lerakódása úgy a koronáriákban, mint más artériákban [83]. A raloxifenről is bebizonyosodott, hogy az E₂-hez hasonlóan gátolta a koleszterin felszaporodását ovariectomizált, bő koleszterindiétán tartott nyulakban [84]. A lipoproteinek mellett kimutatták azt is, hogy az E₂ és a raloxifen hatására kedvezően alakul, szignifikánsan csökken a szérumszintje.

homocisztein szintje, ezáltal csökken a vaszkuláris megbetegedések kockázata [80, 81]. Az E₂ szubsztitúcióval ellentétben azonban a raloxifenkezelés csökkenti a szérumbfibrinogén-szintet, amely a szívinfarktus kialakulásának önálló kockázati tényezője [80, 81]. Emellett a C-reaktív protein gyulladási faktor tekintetében is különbséget találtak a két kezelés hatása között, az E₂ - pótló kezelés szignifikánsan emeli, amíg a raloxifenkezelés nem befolyásolja a koncentrációját [80, 81]. Az E₂ kezelés során megemelkedett C-reaktív protein szintje ugyanis fontos szerepet játszhat a már károsodott koronárisfal talaján kialakult elzáródásban [80, 81] (4. ábra).

Egy vizsgálatban (RUTH: Raloxifene Use for the Heart), amelyet posztmenopauzában lévő nők bevonásával végeztek, akik bizonyítottan koronária-betegségben szenvedtek vagy fennállt náluk a koronária-betegség fokozott kockázata, a raloxifen nem befolyásolta a miokardiális infarktus, az akut koronária szindróma következtében történő hospitalizáció, az ösztromortalitás vagy stroke incidenciáját a placebo csoporthoz képest.

Az ösztrogén és a SERM raloxifen hatása a szérumlipidekre, a véralvadási és a gyulladási faktorokra		
	ösztrogén	raloxifen
LDL-koleszterin	-12*	-12*
HDL-koleszterin	7*	0
Triglicerid	18*	-4
Apolipoprotein A1	13*	3
Apolipoprotein B	-4	-9*
Lp(a) lipoprotein	-19*	-7*
Fibrinogén	-1	-10*
1-es típusú plazminogénaktivátor-inhibítor	-19*	8
Homocisztein	-7*	-8*
C-reaktív protein	84*	-7
Tumornekrózis-faktor α	-11*	-5*
Interleukin-6	11	1

4. ábra: Az E₂- és raloxifenkezelés hatása a szérumlipidekre, a gyulladási és véralvadási faktorokra A * p < 0,05 szignifikáns különbséget jelöl kontroll csoporthoz viszonyítva

4.7. Hem-oxigenáz és nitrogénmonoxid-szintáz enzimrendszer

A hem-oxigenáz (HO) egy mikroszómaenzim, ami több fiziológiai és patofiziológiai folyamat, mint az endoteliális sejtek integritása és az oxidatív stressz szabályozásában is részt vesz. HO-

aktivitást számos szövetben, például a szívben és a vaszkuláris endotéliumban is megfigyeltek. Több enzim is tartalmaz hemet proszterikus csoportként, ami a szolubilis guanilát-cikláz (sGC), NOS, citokróm P450, monooxygenázok, ciklooxigenázok és a kataláz aktivitásának szabályozásán keresztül fontos szerepet játszik az endoteliális sejtek működésében [85].

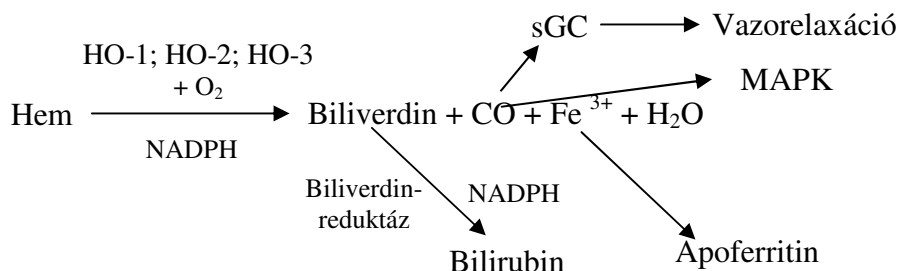
A HO enzimrendszer tagjai a konstitutív HO-2 és HO-3, valamint az indukálható izoforma, a HO-1 (Hsp32) [86], amit valószínűleg nagymértékben indukál az oxidatív stressz [87]. A HO-1 indukciója gyulladásgátló hatással bír [88], de az enzim citoprotektívnek bizonyult atheroszklerózis [89, 90] szepszis [91], diabétesz [92], tüdősrülés [93], vaszkuláris megbetegedések és iszkémia esetén. A HO-1 enzim különböző stimulusok hatására képes expresszálni. Ilyenek például a hem, vagy annak oxidációs terméke, a vas, illetve a hemin, a NO, a reaktív oxigénradikálok valamint a nehézfémek [94-96].

A HO-1 tulajdonképpen egy antioxidáns enzim [97], mivel csökkenti a kifejezetten prooxidáns hatású hem képződését úgy, hogy ezáltal emeli a biliverdin- és bilirubinszintet. Ezen hatása miatt képes csökkenteni a lipidperoxidáció mértékét [98-101].

A HO-2 enzim expresszióját intrakardiális neuronokban is kimutatták [102]. Megfigyelték, hogy a HO-2 révén felszabaduló bilirubin védi a neuronokat az oxidatív stressztől [103], és valószínű, hogy az endotéliumban, illetve a neuronokban található HO-2 aktivitása szerepet játszik az erek érendotélium-függő fiziológiás relaxációjában [104].

A HO-3 szintén konstitutív izoforma, melyet számos szövetben leírtak már – máj, szív, vese, agy, here [105, 106], de a pontos biológiai funkciója ismeretlen [107]. Amellett, hogy a HO-3 90 %-os homológiát mutat a HO-2 enzimmel, a katalitikus aktivitása alacsonyabb [108].

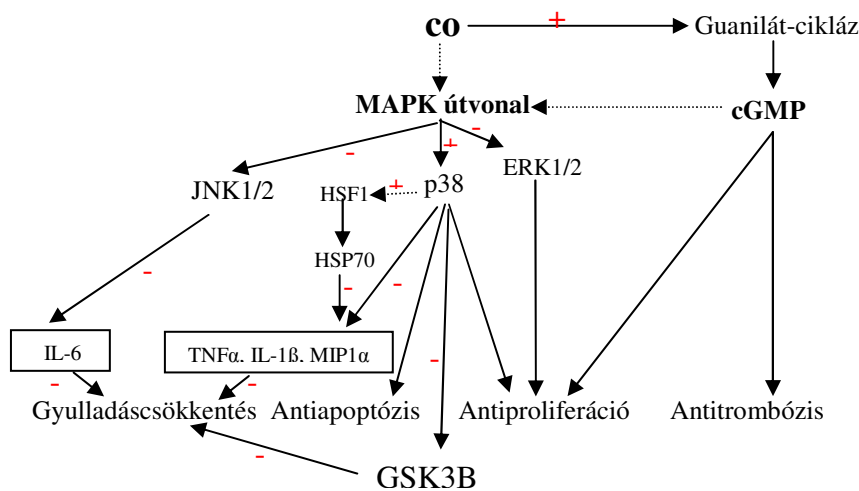
Mind a HO-1, mind a HO-2 fontos szerepet játszik a hem lebontásában, és hasonlóak a hemoxidáció mechanizmusa, kofaktorok, szubsztrátspecifitás, valamint a gátló hatású szintetikus metalloporfirinekkel szembeni érzékenységük tekintetében, melyekben a központi vasatomot cink, ón vagy más elemek helyettesítik. A HO enzimek lebontják a porfirinyűrűt, ami ekvimoláris mennyiségű biliverdint, szabad vasat (Fe^{3+}) és szén-monoxidot (CO) eredményez [94, 95, 98] (5. ábra).



5. ábra: A HO enzimek feltételezett hatásmecmanizmusa

A folyamat egyik meghatározó lépése a hem biliverdinné történő degradációja. A biliverdint viszont a citoszolban található biliverdin-reduktáz NADPH felhasználásával bilirubinná alakítja. A biliverdin és a bilirubin redukáló gyökök, így potenciálisan antioxidáns hatással bírnak. A bilirubin biológiai hatásai valószínűleg nagy jelentőségűek a tumornekrózis-faktor (TNF) és az angiotenzin II oxidánsmediált vazokonstriktív hatásainak kivédésében [109, 110]. A bilirubin kis koncentrációban eliminálja a reaktív oxigéngyököket (ROS) *in vitro*, mérsékli a sejtek oxidánsok hatására bekövetkezett károsodását, valamint enyhíti az oxidatív stresszt *in vivo* [111], ezeken túl pedig részt vesz a kísérletes diabéteszben kialakuló oxidatív stressz mérséklésében részben azáltal, hogy növeli az endoteliális sejtek integritásához szükséges NO biológiai hozzáférhetőségét.

In vivo szinte az összes CO a lebontás során keletkezik, és képes az antioxidáns gének indukálására: szintén csökkenti a szuperoxid gyökök (O_2^-) mennyiségét [112], növeli a GSH-szintet [113], és antiapoptotikus hatással bír [114]. A CO gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatásai a p38 mitogénaktivált protein kináz (MAPK) szignalizációs útvonal modulációjának eredménye [115, 116] (6. ábra).



6. ábra A CO feltételezett szerepe a szöveti károsodás kivédésében.

A protektív hatást eddig két fő vonalon feltételezik. Az egyik során a cGMP serkentése révén szabályozza a NO hatásait, a másik révén pedig a MAPK szignálon keresztül csökkenti a gyulladáskeltő citokinek hatását.

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát, MAPK: mitogénaktivált protein kinázok (p38, JNK1/2, ERK1/2), JNK: Jun N-terminális kináz, ERK: extracelluláris szignál által regulált kinázok, HSF1: hőszokk transzkripciós faktor 1, HSP70: 70-es hőszokkfehérje, IL-6: interleukin 6, TNF α : tumor nekrozis-faktor alfa, IL-1 β : interleukin 1 β , MIP1 α : makrofág gyulladássalos fehérje 1 α . GSK3B: glikogén szintáz kináz 3B.

A CO ezen túl vazodilatátor hatással rendelkezik, ami fontos szerepet játszik az erekben a bazális és a konstriktorindukált vaszkuláris tónus szabályozásában [117]. Mind a CO, mind a HO képes a vérerek vazodilatáción keresztüli relaxációjának indukálására, valamint a VSMC proliferációjának gátlására [85].

A NO-renszerről leírták, hogy kölcsönhat a HO-rendszerrel [118]. A NO L-argininből keletkezik NOS enzim által katalizált reakcióban [119]. A NOS család tagjai a konstitutív endoteliális NOS (eNOS, NOS 3) és neuronális NOS (nNOS, NOS 1), amelyek Ca^{2+} -függő enzimek (cNOS), valamint az indukálható (iNOS, NOS 2) [120]. Megfigyelték, hogy a megnövekedett NO-szint serkentőleg hat a HO expresszióra, a HO-rendszer inhibitorai pedig gátolják a NOS-aktivitást. A NOS/NO és a HO/CO útvonalak közti kapcsolatot, valamint a különböző biológiai funkciókhoz történő hozzájárulásukról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre [121]. Egyre nyilvánvalóbb, hogy a két gáz nem minden esetben hat egymástól függetlenül, hanem inkább modulálják egymás aktivitását. A CO és az NO közti „párbeszéd” arra enged következtetni, hogy „adott rendszerben a CO és az NO közösen fejt ki hatását egy komplex, dinamikus és alkalmazkodásra képes együttműködésben”. Hartsfield összegezte a CO-ról és az NO-ról eddig rendelkezésre álló ismereteket. Hasonló tulajdonságokkal bírnak, mindkettő hírvivőként és jelmolekulaként viselkedik. Az NO-hoz hasonlóan a HO működésének eredményeképp megjelenő CO is hatással van a sGC és a cGMP útvonalakra, melyek a vérnyomás és a vaszkuláris kontraktilitás szabályozásában játszanak szerepet. A sGC a cGMP mennyiségét emeli, ami vazodilatátorként csökkenti a vérnyomást. Megfigyelték, hogy a HO-rendszer működésének serkentésének eredményeképp az sGC és a cGMP szintje növekszik, ami a vérnyomás jelentős csökkenéséhez vezet [122]. A HO-1 aktivitást gátolva viszont patkányokban a vérnyomás jelentős emelkedését tapasztalták [123].

Kísérletes körülmények között az endogén vagy exogén E_2 megnövelte a Ca^{2+} -függő cNOS aktivitást a vaszkuláris szövetekben [124, 125]. SERM vegyületek, mint a raloxifen hatására nagyobb mértékű NO-felszabadulást tapasztaltak patkány aortájában [126]. A vaszkuláris endotéliumban és a neuronális elemekben a cNOS által folyamatosan termelt NO fontos szerepet játszik a vaszkuláris integritás megőrzésében. A cNOS gátlása a vérnyomás emelkedését, a vérlemezkék aggregációját és a neutrofil granulociták vaszkuláris endotéliumhoz történő tapadását eredményezi [127]. Ezen túl kimutatták, hogy az E_2 képes modulálni az AVP-t zártal részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer regulációjában [128].

4.8. A paclitaxel és a HO-1-indukció

A vaszkuláris simaizomsejtek proliferációja központi esemény a vaszkuláris léziók patogenezisében, ami magában foglalja a posztangioplasztia resztenózist és az arterioszklerózist [129]. A stenttel történő lokális hatóanyag-bejuttatás az egyik legígéretesebb módszer az érfal krónikus gyulladásának (resztenózis) korai (neointimális hiperplázia) kezelésében, de alkalmazását jelentősen korlátozza a citosztatikus és citotoxikus vegyületek hosszantartó felszabadítása, a késői reendotelializáció és a hátramaradó hatóanyag-hordozó polimermátrix, ami trombózist és gyulladást okozhat [130, 131].

Az antiproliferatív hatóanyagok nem stenttel történő lokális bejuttatása (kontrasztanyagban oldva vagy hatóanyag-eluáló ballonnal) a koronária léziók kezelésének vonzó módja lehet, amit a hatóanyag-eluáló stentek „off-label” használatára fejlesztettek ki bifurkációs léziókhoz vagy in-stent resztenózishoz [132, 133]. A paclitaxel egy lipofil vegyület, ezért képes átjutni az artériák falán, és a szöveti elemek hidrofób részeihez kötődni, így elkerülhető a hatóanyag artériafalon keresztüli mozgása, ami az atréiás sérülést követően a migráló simaizomsejtekre gyakorolt koncentrált antiproliferatív hatást eredményez. A paclitaxel azáltal, hogy stabilizálja az osztódó simaizomsejtek polimerizált mikrotubulusait, a sejtciklust leginkább a G2/M fázisban megállítva mérsékli a neointimális hiperpláziát [134]. Scheller és munkatársai kontrasztanyagban oldott paclitaxelt alkalmazott koronária intervencióhoz, és a dilatált koronária artériaszegmensekben antiproliferatív hatást és a neointimális hiperplázia lényeges mérséklődését tapasztalták [131]. Az artéria paclitaxellel történő rövid idejű kezelése elegendőnek bizonyult ahhoz, hogy a hatóanyag a véredény falába diffundáljon, amit megerősített a szöveti paclitaxelkoncentráció mérése is. Speck és munkatársai neointimális hiperplázia jelentős redukcióját figyelték meg sertés koronária stent modellben, miután a stenteket paclitaxellel bevont ballonba helyezték [135]. Ezt a tanulmányt követte a paclitaxellel bevont ballon első sikeres humán alkalmazása, megállapítva ezen módszer koronária in-stent resztenózisban történő alkalmazásának biztonságosságát és hatékonyságát [132].

Az effajta hatóanyag-bejuttatással szembeni legfontosabb követelmény a lokálisan bevitt paclitaxel növekedésgátlás érdekében történő gyors felvétele a véredény falán keresztül. A hatóanyag-eluáló stentekkel ellentétben a gyógyszerrel bevont ballon használatakor a vegyület bejuttatása nem korlátozódik a stenttel dilatált területre, ami a kezelt léziótól proximális és disztális irányban elhelyezkedő szegmensek megnövekedett védelmét is eredményezi.

A paclitaxelt számos előnyös tulajdonsága teszi a ballon-angioplasztiát vagy stentbeültetést követő resztenózisban történő túlzott artériás simaizomsejt-proliferáció elleni lokális

hatóanyagterápia ígértés jelöltjévé. Ezen tulajdonságokat *in vitro* [136], állatmodellekben [137] és a klinikai kísérletekben [138] is tanulmányozták. A paclitaxel vaszkuláris sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatását *in vitro* VSMC-eken és *in vivo* arteria carotis sérülés modellben tanulmányozták patkányokon [139]. A paclitaxel *in vitro* nanomólos mennyiségben is befolyásolta a VSMC-ek proliferációját és migrációját, és *in vivo* megelőzte a neointimális VSMC akkumulációt az arteria carotisban [140]. Annak lehetőségét is vizsgálták, hogy a paclitaxel antiproliferatív hatásai között szerepel-e a HO-1-indukció. A paclitaxel indukálja a HO-1 gén expresszióját és a CO-felszabadulást a VSMC-ekben, és a HO-aktivitás paclitaxel által mediált emelkedése hozzájárul a vegyület antiproliferatív hatásához. A HO-1 útvonal antiproliferatív hatását patkány VSMC-ekben írták le *in vitro* [141, 142], majd *in vivo* állatmodellekben is megerősítették a ballonsérülést követő vaszkuláris újjáalakulás során [143]. A HO-1 által katalizált CO-felszabadulás fontos adaptív mechanizmust is biztosíthat a homeosztázis fenntartásához a vaszkuláris sérülés helyszínén. Bizonyítást nyert, hogy a HO-1 közrejátszik a paclitaxel VSMC-proliferációra gyakorolt szuppresszív hatásában. Ezen hatást a HO-inhibitor ZnPP-IX (cink-protoporfirin IX) semlegesíti, ami arra enged következtetni, hogy a paclitaxel által indukált HO mediálja a paclitaxel PDGF (Platelet Derived Growth Factor)-függő VSMC-proliferációra gyakorolt gátló hatását. A VSMC-proliferációt a CO gátolja [142, 144]. Egyéb eredmények szintén alátámasztják és kiszélesítik a HO-1 működéséből származó CO-nak a paclitaxelkezelés eredményeképpen bekövetkező, VSMC-proliferációra gyakorolt gátló hatását. Következtetésképpen megállapították, hogy a paclitaxel indukálja a HO expresszióját, és valószínűleg ez a felelős a hatóanyag VSMC-ekre kifejtett antiproliferatív hatását [145].

4.9. Aginin-vazopresszin (AVP)

Az AVP egy neurohipofízisben termelődő nonapeptidhormon, ami számos stimulus hatására bekerülhet a keringésbe; és antidiuretikus, illetve vazopresszor hatással bír [146, 147]. Az antidiuretikus (V_2) receptorok aktivációján keresztül a víz vesetubulussejtekbe történő reabszorpcióját segíti elő [148]. Az AVP további, vazokonstriktóra, vérlemezke-adhézióra és koronária simaizomsejt-proliferációra gyakorolt hatásai a presszor (V_1) receptorokon keresztül érvényesül.

A posztmenopauzás nők körében előforduló kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás következményeképp a raloxifen, mint az egyik legígéretesebb SERM vaszkuláris protektív hatása az érdeklődés középpontjába került. Munkánkban a raloxifen által kifejtett

kardiovaszkuláris protekció mechanizmusát tanulmányoztuk a 17- β -ösztradiol-kezelés megfelelő hatásával összehasonlítva. A menopauzához hasonló állapotot bilaterális ovariektómiával idéztük elő patkányokban. Mivel az E₂ és a raloxifen képes a vasoaktív hormonok vaszkuláris hatásainak befolyásolására [149], és a különböző hormonok kardiovaszkuláris hatásai AVP-specifikusak [150], az E₂, a raloxifen és az AVP közti interakciókat vizsgáltuk a kardiovaszkuláris szabályozás tekintetében.

5. Célkitűzések

Az E₂-hiányos állapot és a hatékony E₂-pótlás a menopauza kezelésének sokat vitatott, nagy érdeklődésre számot tartó aktuális kérdése. Az új generációs SERM vegyületek megőrizték az E₂-ek kedvező hatását a csont-, szív- és érrendszerre, viszont kiküszöbölik az emlőre és a méhre kifejtett kedvezőtlen hatásokat. Ebből az következik, hogy klinikai alkalmazásuk, mint a hormonpótló kezelés alternatívája, szóba jön a menopauza bizonyos állapotaiban. A SERM vegyületek hosszútávú alkalmazásának feltétele, hogy biztonságosak legyenek a menopauza után egyre gyakrabban jelentkező betegségekben, mint pl. a II. típusú diabétesz melituszban, iszkémiás szívbetegségben, valamint egyes központi idegrendszeri elváltozásokban.

Vizsgálataink során a szexuálszteroid-hiány, illetve az E₂-, valamint a raloxifenkezelés hatásait elemeztük. Tisztázni kívántuk, hogy:

1. E₂ hiány kardiovaszkuláris hatása

1.1. Hogyan befolyásolja a hormonhiányos állapot a plazma AVP szintet, a bazális vérnyomást, illetve a szívizomisztkémiára való hajlamot? Hogyan változik az AVP-re adott vérnyomásválasz, érkontrakció és szívperfúzió hormonhiányos állapotban?

1.2. A hormonhiányos állapothoz viszonyítva az ösztradiol-monoterápia valamint raloxifen-szubsztitúció hogyan befolyásolja a plazma AVP szintet, a bazális vérnyomást, illetve a szívizomisztkémiára való hajlamot, az AVP-re adott vérnyomásválaszt, aortakontrakciót és szívperfúziót?

1.3. Kísérleteink során vizsgáltuk a HO enzim ösztrogén-közvetítette kardiovaszkuláris szerepét.

2. Kardiovaszkuláris betegségek helyi gyógyszeres kezelése

2.1. A dilatált artériafal és a környező szegmensek szöveti paclitaxelkoncentrációját meghatározva alá kívántuk támasztani a koronária artéria falába történő paclitaxel-felvételt hatóanyagelűlő ballonnal véghezvitt, egyes koronária artériaszegmenseket illetve bifurkációkat érintő kezelést követően.

6. Anyagok és módszerek

6.1. E₂ hiány kardiovaszkuláris hatásai

6.1.1. Vizsgált állatcsoportok

A vizsgálatainkhoz azonos korú (10-12 hetes) 230-250g tömegű hím és nőstény Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat standard körülmények (hőmérséklet, világítás) között tartottuk. A patkányok csapvizet ad libitum kaptak és standard granulált patkánytápot (LATI, Gödöllő) fogyasztottak. Minden vizsgálati csoport legalább 7 random módon kiválasztott egyed tartalmazott. A nőstényeket az ösztusz fázisuk reggelén és diösztusz fázisban vizsgáltuk. A nőstények adott csoportjain bilaterális ovariectomiát hajtottunk végre éteraltatásban, majd egy hónapig hagytuk őket regenerálódni. Az ovariectomizált állatok egyes csoportjait két hetes ösztradiol- (E₂: 0,10 mg/kg/nap, per os, naponta egyszer) illetve raloxifen- (R0,11: 0,11 mg/kg/nap; R0,33: 0,33 mg/kg/nap; R1: 1,0 mg/kg/nap, per os, naponta egyszer) kezelésnek vetettük alá. A HO enzimek aktivitását ón-protoporfirin IX-cel gátoltuk le (SnPP: 30,0 µg/kg, s.c., pH 7,40, 24 és 1 órás előkezelés). A kísérlet során az állatok gondozása és laboratóriumi felhasználása az EU szabványaival összhangban és az intézet etikai bizottságának jóváhagyásával végeztük.

Csoportok:

- Hím
- Ösztuzszos nőstény
- Diösztuzszos nőstény
- Ovariectomizált nőstény (OVX)
- 17-β-ösztadiol-kezelt ovariectomizált nőstény (E₂)
- 0,11 mg/kg raloxifennel kezelt ovariectomizált nőstény (R0,11)
- 0,33 mg/kg raloxifennel kezelt ovariectomizált nőstény (R0,33)
- 1,0 mg/kg raloxifennel kezelt ovariectomizált nőstény (R1)

6.1.2. A reprodukív fázis meghatározása Giemsa-festéssel

A nőstény patkányok reprodukív ciklusa proösztroz, ösztroz, metösztroz és diösztroz fázisokból áll. Az ovuláció a proösztroz kezdetétől az ösztroz végéig tart. Az ivarérettség elérésétől 12 hónapos korig a ciklus átlagos hossza négy nap. Az ösztroz ciklus alatt a prolactin, az LH és az FSH alacsony szintet mutat, de a proösztroz fázis délutánján megemelkedik. Az ösztradiolszint a metösztrozban kezd növekedni, a proösztroz alatt és az ösztroz reggelén eléri maximumát, majd az ösztroz estjén alapszintre tér vissza. A progeszteronszokréción szintén emelkedést mutat a metösztroz és a diösztroz alatt, ezután lecsökken, majd egy második maximumot ér el a proösztroz vége felé. Az egyes fázisok a hüvelykenetben található három sejttípus: epitheliális sejtek, elszarusodott sejtek és leukociták arányával jellemezhetőek. A proösztrozban a sejtmaggal rendelkező epitheliális sejtek dominanciája a jellemző, az ösztrozos kenet leginkább sejtmag nélküli összetapadt elszarusodott sejteket tartalmaz, a metösztroz fázisban egyenlő arányban található a leukociták, elszarusodott és sejtmaggal rendelkező epitheliális sejtek, míg a diösztrozban vett kenetben a leukociták dominálnak [151]. A mintavételezés fiziológias sóoldattal átítatott, majd a nőstény patkány vaginájába helyezett vattával történt, mellyel tárgylemezen kenetet készítettünk. A lánggal rögzített mintán Giemsa-festést alkalmaztunk, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

6.1.3. A plazma AVP szintjének meghatározása

A plazma AVP szintjét a korábban leírt [152] majd módosított [153, 154] radioimmunoassay (RIA) módszerrel mértük. Az antitesttermelés és a radiojelölés referenciájaként szintetikus arginin-8-vazopresszin (Organon, Oss, Hollandia, antidiuretikus aktivitás: 408 IU/mg) alkalmazták. A vazopresszin antitestet a vazopresszin-(ϵ -aminocaproicsav)-thyroglobulin konjugátummal szemben juhban termeltették. Immunizáláskor az állatok 1,0 mg, 1,0 ml Freund adjuvánsban emulgeált immunogént kaptak, az emulziót intradermálisan injektálták az állatok hátába a lehető legtöbb helyen. Az immunizálást 12 héten keresztül 2 hetente, majd havonta végezték. Az antiszérumokat nagyjából 50,0 % jódozott vazopresszin megkötéséig titrálták. 1:350000-es antitesthígítást alkalmaztak. [Lys⁸]-vazopresszinnel (Organon, Oss, Hollandia) 23,3 %-os, des-Gly-NH₂⁹-[Arg⁸]- vazopresszinnel (Organon, Oss, Hollandia) 0,12 %-os, oxitocinnal (Gedeon Richter, Budapest, Magyarország) kevesebb, mint 0,01 %-os, adrenocorticotrop hormonnal (1-24) (Organon, Oss, Hollandia) 0,03 %-os, és 1-deamino-8-D-arginin-

vazopresszinnel (Per Melin által biztosítva, Ferring Research Laboratory, Malmö, Svédország) 10,7 %-os keresztreakciót tapasztaltunk. A vazopresszin ^{125}I -jelölését chloramine T módszerrel [155] hajtották végre, és a jelölt hormont reverz fázisú kromatográfiával [156] tisztították. Az [^{125}I] vazopresszin specifikus aktivitása a különböző kísérletekben 49,90 és 61,10 TBq/mmol közé esett. A vérmintákat dekapitálást követően vettük le, és 1,0-1,0 ml-es mennyiségeket hűtött, 1,40 mg Na_2EDTA és 30,0 μl izotóniás NaCl -ot tartalmazó polisztrén csövekbe tettünk [157], majd 10 percen belül lecentrifugáltuk (1000 g, 10 perc, 4 °C), és a plazmamintákat felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A RIA kísérleteket a mintavételt követő 72 órán belül végeztük el. A vazopresszint a plazmamintákból Amprep C8 minicolumnnal (RPN 1902, Amersham, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) vontuk ki, a standard görbék a csövenkénti 1,0-128,0 pg-os tartományba estek. A referenciákat homozigóta, diabetes insipidusban szenvedő patkányok (CPB-TNO, Zeist, Hollandia) 1,0 ml vazopresszinmentes plazmájából készítettük. Az extrakciót két párhuzamosban hajtottuk végre, a liofizátumot 125,0 μl RIA pufferben oldottuk fel, és a RIA kísérletekben 50,0 μl -es mennyiségeket használtunk, két párhuzamosban végezve a vizsgálatokat. A RIA érzékenysége csövenként 1,0 pg volt, a plazma AVP szintek pg/ml-ben vannak feltüntetve.

6.1.4. Túlélő patkány aortagyűrű-kontrakció mérése

Dekapitálást követően az állatok hasi aortáját kipreparáltuk, Krebs-Henseleit bikarbonát oldatba (37 °C, 95,0 % O_2 /5,0 % CO_2) (118 mM NaCl ; 25 mM NaHCO_3 ; 1,18 mM KH_2PO_4 ; 4,7 mM KCl ; 1,18 mM MgSO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 5,5 mM glükóz; pH 7.4) [158] helyeztük, majd a zsír- és kötőszöveti elemek eltávolítása után az aortagyűrű tömegét lemértük és két rozsdamentes acélhorogra tettük. Az alsó horog egy rögzített rozsdamentes acélrúdhoz csatlakozott, a felső pedig egy transducerrel állt összeköttetésben az izometriás nyomás mérése céljából. Az aortafeszülés folyamatos mérése érdekében a transducer ISOSYS számítógépes programhoz (Experimetria, London, Egyesült Királyság) volt csatlakoztatva. A felhelyezést követően a gyűrűket azonnal 15,0 ml 37 °C-os, 95,0 % O_2 – 5,0 % CO_2 -dal dúsított inkubációs oldatot tartalmazó szervedényben inkubáltuk 20-30 percig, 2,50 g passzív nyomáson, majd 2,0 $\mu\text{g/ml}$ AVP-t adtunk az inkubációs elegyhez. A kísérletek előtt fokozatosan növekvő vazopresszinmennyiségek hozzáadásával kiszámítottuk az AVP-re adott optimális kontrakciós választ, amit az aortagyűrű nyomásával fejeztünk ki (g/mg aortagyűrű).

6.1.5. Fehérjemeghatározás

Kereskedelmi forgalomban kapható protein assay kitet alkalmaztunk, és desztillált vízzel a 25- illetve 50-szeresre hígított mintákból 20,0 µl-es mennyiségeket kevertünk 980,0 µl desztillált vízbe, majd 20 µl Bradford reagenst adtunk az elegyekhez. Keverés és 10 perc inkubáció után a mintákat spektrofotometriásan vizsgáltuk 595 nm-es hullámhosszon, a proteinszinteket mg protein/ml-ben adtuk meg.

6.1.6. HO-aktivitás meghatározása

Az állatokon cervikális diszlokációt végeztünk, majd az eltávolított bal kamra és aorta abdominalis szöveteket jégen tartott pH 7.4 -es, 10,0 mM N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etánszulfonát (HEPES), 32,0 mM szacharóz, 1,0 mM dithiotreitol (DTT), 0,10 mM EDTA, 10,0 µg/ml tripszin inhibitor, 10,0 µg/ml leupeptin és 2,0 µg/ml aprotinin tartalmú elegyben homogenizáltuk (Ultra Turrax T25; 13500 min⁻¹; 2x30 s). A 1,5 ml végtérfogatú, 2,0 mM glükóz-6-foszfátot, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt, 15,0 µM hemint, biliverdin-reduktáz forrásként 120,0 µg/ml patkánymáj-citoszolt, 2,0 mM MgCl₂·6H₂O-t és 100,0 mM KH₂PO₄-ot tartalmazó reakcióelegyhez 150,0 µl-nyi, centrifugálással (20 perc, 15000 g, 4 °C) nyert felülúszót adtunk. A reakció elindításához 100,0 µl β-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (β-NADPH; 150.0 µM) adtunk a mintákhoz, majd sötétben, 37 °C-on inkubáltuk őket 60 percen keresztül. A reakció leállítására érdekében a mintákat jégre tettük. Standardként bilirubin oldatot (58,47 µg/ml; 10,0 µM) alkalmaztunk, és a képződött bilirubin mennyiségét a 464 és 530 nm-en mért optikai denzitások különbsége alapján számítottuk ki. A fehérjetartalmat spektrofotometriásan határoztuk meg (Bio-Rad Protein Assay). A HO aktivitás egységét a következőképpen adtuk meg: képződött bilirubin (nmol)/h/mg fehérje [159].

6.1.7. HO-1- és HO-2-expresszió meghatározása

Az állatokon cervikális diszlokációt hajtottunk végre, majd a HO-1 és HO-2 enzimek expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk [160, 161], [162]. Az eltávolított bal kamra és aorta abdominalis szöveteket jégen tartott Tris-mannitol puffer (2,0 mM Tris 7-9, 50,0 mM mannitol, 100,0 µM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 2,0 µM leupeptin, 0,50 mU/ml aprotinin, 0,50 % Triton X-100 tartalmú elegyben homogenizáltuk (Ultra Turrax T25; 13.500

min⁻¹; 2 x 30 s), majd a kapott homogenizátumokat lecentrifugáltuk (20 perc, 12000 g, 4 °C). A fehérjetartalmat spektrofotometriásan mértük (Bio-Rad Protein Assay). A felülúszót 1:1 arányban hígítottuk (20 mM Tris 7-9; 3 mM EDTA; 2 % SDS; 10 % β-merkaptoetanol; 20 % glicerol), majd denaturáltunk (100 °C-os vízfürdő, 3 perc). A 50 µg fehérjét tartalmazó mintákat ezt követően 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen megfutattuk (100 V, 50 mA/gél), és nitrocellulóz membránra (Hybond ECL Nitrocellulose membrán, Amersham, Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK) transzferáltuk át (100 V, 100 mA/gél, 2 óra). A 2 órás blokkolást (PBS pH 7.4; 0,25%-os Tween 20, 5%-os sovány tejpor) követően egér anti-HO-1 (1/10000; 2 h) illetve anti-HO-2 monoklonális antitestet (1/1000; 2 h) (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Kanada) alkalmaztunk. Az inkubáció után PBS-tween 20-as oldattal mostuk a membránt (3x15 perc). Ezt követően torma-peroxidázzal kapcsolt egér antitesttel (1/2000; 1 óra; 25 °C Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Ca, USA) végeztünk inkubációt. Ismételt mosás után a membránokat egy kemilumineszcens rendszer (ECL+Plus, Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK) segítségével láthatóvá tettük és Hyperfilmre (Biomax light-1, Eastman Kodak Comp. Rochester, New York) exponáltuk. A filmeket Uvisoft Software-rel (Iconix, Toronto, Kanada) történő scannelést követően UviproChemi (Egyesült Királyság) segítségével elemeztük.

6.1.8. A bazális vérnyomás és az AVP-re adott válasz mérése

A állatokat 30 % uretánnal történő anesztézia (0,50 ml/100 g, i.p.) után fentolaminnal (10,0 mg/kg, i.p.) kezeltük, majd a vérnyomás stabilizálódását követően AVP injekciót (0,02; 0,06; 0,18 µg/kg, i.v.) adtunk a laterális farovénába [163-165]. A preparálás első lépéseként a nyak középvonalában hosszanti metszést végeztünk, az izmokat tompán szétválasztottuk, majd a nervus vagust és a szimpatikus idegkötegeket különválasztottuk. Az arteria carotist a fej felőli végén elkötöttük, az alsó részen a másik fonálból kis hurkot készítettünk. Az alsó részen egy ércsipesszel a carotist elszorítottuk. A két elszorítás között az eret érollóval bemetsztük, a résbe polietilén kanült vezetünk és fonál lekötéssel rögzítettük. A kanült csatlakoztattuk a Statten fejhez, melynek érzékelő membránja a vérnyomásváltozást elektromos jellé alakítja. A vérárvadás megakadályozása végett 10 %-os heparinnal töltöttük meg a kanült. A vérnyomás-emelkedést (a maximális %-os emelkedés a bazális értékhez viszonyítva) a jobb oldali arteria carotisban mértük. A vérnyomásmérés eredményeit a HAEMOSYS program (Experimetria, UK, London) segítségével értékeltük. Az állatok testhőmérsékletét 37 °C-on tartottuk.

6.1.9. Szívperfúzió mérése Langendorff szerint

Az állatoknak a cervikális diszlokációt megelőzően 10-20 perccel heparin injekciót adtunk (500 IU, i.p.), majd a szívüket gyorsan izoláltuk (perfúzióig eltelt idő átlagosan 2 perc), és Langendorff perfúziós oszlopra helyeztük. A szíveket az aortán keresztül perfundáltuk a Langendorff-módszer alapján, 70 Hgmm állandó nyomáson, 37 °C hőmérsékleten. Perfúziós elegyként 118 mM NaCl, 4,70 mM KCl, 2,50 mM CaCl₂, 1,18 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,18 mM KH₂PO₄ és 5,50 mM glükóz tartalmú Krebs-Henseleit puffert használtunk. A perfúziós elegyet 95 % O₂/5 % CO₂-dal karbonátosítottuk, és a pH-ját 7.4 -re állítottuk be. Az AVP-re (1,0; 3,0; 10,0 µg) adott válaszként megjelenő szívperfúziót 15 perces stabilizációs periódus elteltével mértük, és % -ban fejeztük ki a bazális értékkel összehasonlítva.

6.1.10. Adrenalin és fentolamin által kiváltott experimentális angina modell

Az kísérleti állatokat uretánnal (30 %, 0,50 ml/100g, i.p.) altattuk el. Az állatok testhőmérsékletét 37 °C-on tartottuk. Kanült helyeztünk a tracheába, hogy biztosítsuk a spontán légzést, és az arteria carotisba, amelyen keresztül mértük az artériás vérnyomást. 15 perc stabilizáció után a HEMOSYS számítógépes mérő és analízáló rendszer segítségével regisztráltuk az artériás középvernyomást és a testfelszíni II. EKG-t. A szívizkémia meghatározásához az ST változását használtuk fel. ST szegmens értéként az S hullám csúcsa után 13 ms-mal mért átlagos ECG feszültséget definiáltuk [166, 167]. Kiszámoltuk az anginát kiváltó ágensek alkalmazása előtti és utáni, ST szegmens amplitúdókban tapasztalt különbségeket, és mV-ban fejeztük ki az ST szegmens depresziójaként. Az epinefrin-fentolamin modellben egyetlen dózisnyi epinefrin (10,0 µg/kg) majd 30 s elteltével α-adrenoceptor antagonistá fentolamint (15,0 mg/kg) adtunk az állatok farki vénájába. Az egyes ágenseket 0,20 ml fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Az ECG és vérnyomás változásait párhuzamosan követtük.

6.1.11. Vegyszerek

Raloxifen (R; Eli Lilly and Company USA), Arginin-vazopresszin (AVP; Organon, Hollandia), 17-β-ösztradiol (Ösztradiol, E₂; Novo Nordisc, Dánia), Uretán (Reanal, Magyarország), Fentolamin (Regitin, P; Ciba-Geigy, Svájc) és ón-protoporfirin IX (SnPP; Frontier Scientific

Europe, Egyesült Királyság). Az itt fel nem sorolt vegyszereket a Sigma International biztosította.

6.1.12. Statisztikai analízis

Az adatok $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ -ként vannak kifejezve. A Western-blot kísérletek eredményeit reprezentatív fényképeken mutatjuk be. A statisztikai szignifikanciát Mann W. féle teszttel állapítottuk meg, és az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

6.2. Kardiovaszkuláris betegségek helyi gyógyszeres kezelése

6.2.1. A kísérleti állatok előkészítése

12 órás éheztesítés után nyolc 18-30 kg tömegű nőstény házi sertésnek 12,0 mg/kg ketamin-hidrokloridot, 1,0 mg/kg xylazint és 0,04 mg/kg atropint adtunk, és 24 órával a beavatkozás előtt az állatok clopidogrelt (300 mg per os) és aszpirint (250 mg per os) kaptak. Intratracheális intubációt követően steril körülmények között elvégeztük a jobb oldali femorális artériák arteriotómiáit [168]. 200 IU/kg heparin-nátrium beadása után végrehajtottuk a jobb és bal oldali koronária artériák szelektív angiográfiáját, és guide wire-t vezettünk a bal oldali leszálló (LAD), bal oldali circumflex (LCx) és jobb oldali koronária artériák (RCA) disztális részébe. A proximális RCA, illetve a első nagy diagonális leágazódásai után egy 2,75-3,0 mm átmérőjű, 15 mm hosszú Dior-ballon katétert (Eurocor, Bonn, Németország) helyeztünk a LAD-ba és az LCx-be. A ballont felfújtuk, és 30 s-on keresztül 6 atm nyomáson tartottuk, utána leengedtük, és újra felfújtuk (30 s, 6 atm). A koronária angiográfia alátámasztotta, hogy a ballon minden dilatáció esetében teljes mértékben érintkezett az érfallal. Ezen túl 6 artérián bifurkációs intervenciókat végeztünk el a következő módon: elsőként az első fő, majd az oldalágat tágítottuk ki a Dior-ballonnal (6 atm, 2x30), amit kissing ballon dilatáció követett. Az utolsó kissing ballon dilatációt megelőzően 4 artéria fő ágába 3,0 mm átmérőjű, 15 mm hosszú stente(ke)t helyeztünk. A Dior-ballon-inflációk után 1,5, 12, 24 vagy 48 után az állatokon telített KCl-dal eutanáziát végeztünk, a szívet eltávolítottuk, és a dilatált (és stent-tel kezelt) LAD, LCx és RCA koronária artériaszegmenseket kipreparáltuk, proximális, középső és disztális részekre vágtuk további proximális és disztális referenciaszegmensekkel együtt (a dilatált résztől proximális ill. disztális irányban legalább 10 mm távolságra), majd folyékony nitrogénnel fagyasztottuk le a

szöveti paclitaxel koncentrációk meghatározásához. A szövetek előkészítése előtt a stent-eket eltávolítottuk a fő ágakból.

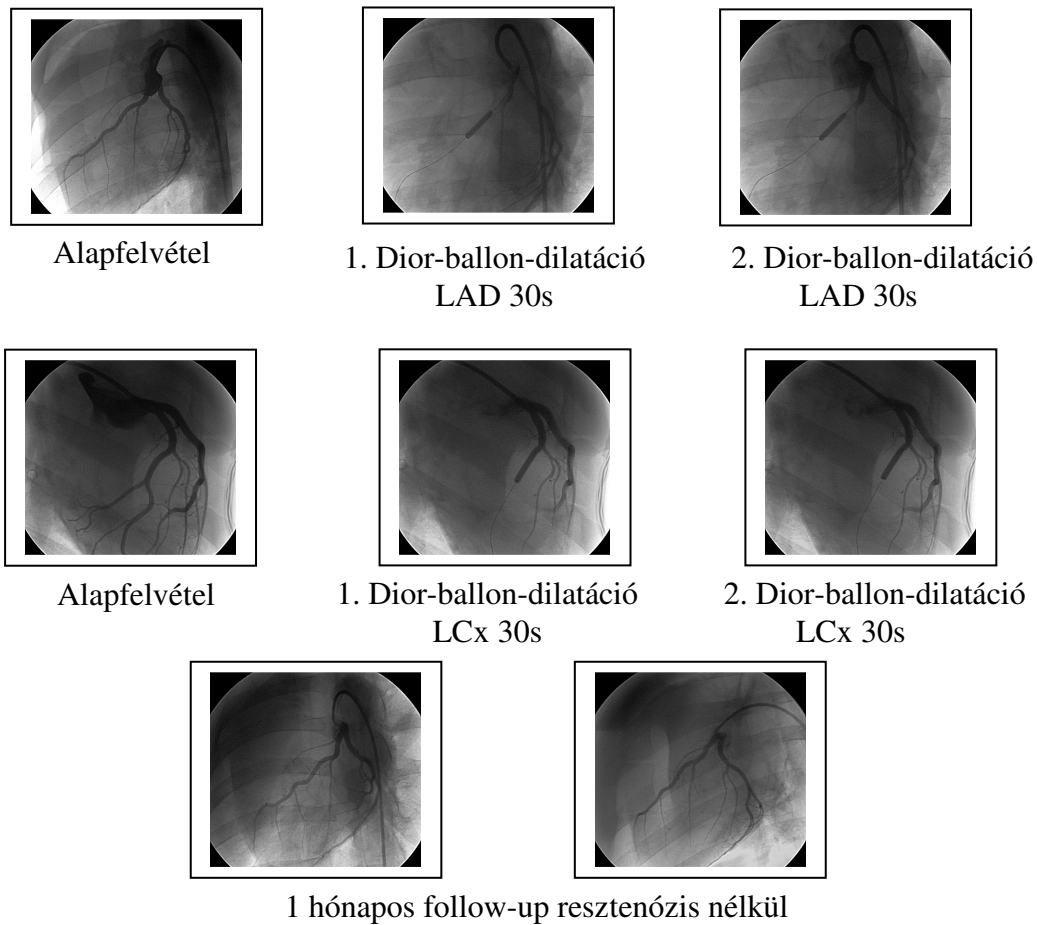
A kísérleteket a Kaposvári Egyetemen, Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében végeztük a “Principle of laboratory animal care” (NIH publication No. 86-23, revised 1985) és a vonatkozó magyar törvények betartásával (7. ábra).

6.2.2. Lokális hatóanyag-bejuttatás

A Dior-ballon egy koronária dilatációs ballon, aminek a felszínét a humán gyógyászatban paclitaxellel vonják be (3,0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, effektív bejuttatott dózis: 2,0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$). A vegyületet a mikroporózus ballon felszínére viszik fel.

6.2.3. Paclitaxelkoncentráció meghatározás

A plazma, LAD, LCx, és RCA paclitaxel koncentrációit high-performance liquid chromatography (HPLC) (AnaKat Institut für Biotechnologie GmbH, Berlin, Németország) módszerrel határoztuk meg. Felolvasztás után a szövetminták tömegét lemértük ambient hőmérsékleten, és a tömegüknek megfelelő mennyiségű etanolt adtunk hozzájuk. Ezután a mintákat 40 perces ultrahangkezelésnek vetettük alá, és 200 μl -es mennyiségeket lecentrifugáltunk. A kalibrációs egyenest 50 és 5000 ng/ml között vettük fel, melynek elkészítéséhez a mintákat 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es törzsoldatból hígítottuk. A szövetekből származó és a kalibrációs egyenes felvételéhez használt mintákhoz megegyező térfogatú 0,1 %-os hangyasavat adtunk. A HPLC rendszer flow rate-je az ODS Hypersil oszlopon (részecskenagyság: 5 μm , pórusméret: 120 Å ThermoElectron Corporation) keresztül 0,2 ml/min volt, a mobil fázis 70 % metanolt és 30 % desztillált vizet 0,1 %-os és hangyasavat tartalmazott. A paclitaxelt tömegspektrometriásan mutattuk ki, és a szöveti paclitaxel koncentrációt $\mu\text{M}/\text{L}$ -ben fejeztük ki.



7. ábra . Dior-ballonnal kivitelezett koronáriadilatáció házi sertésben

6.2.4. Statisztika

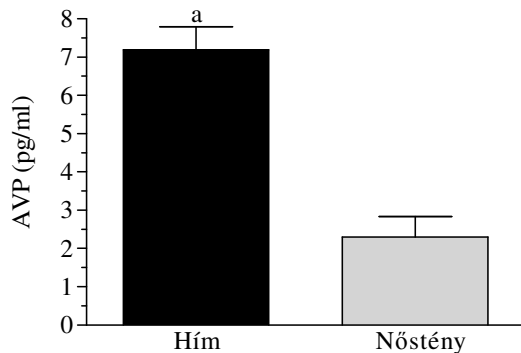
A csoportok folytonos paramétereit átlag \pm SD-vel adtuk meg. Az egyes artériaszegmensekben (proximális, középső és disztális) mért szöveti paclitaxel koncentrációkat csoportosítottuk, és a csoportosított átlagértékeket hasonlítottuk össze páratlan t-teszttel. A különbségeket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai elemzést az SPSS for Windows version 11.5. programmal végeztük.

7. Eredmények

7.1. Nemi dimorfizmus

7.1.1. Hím és nőstény patkányok plazma AVP szintje

A plazma AVP szinteket RIA módszerrel tanulmányoztuk, és hím állatokban szignifikánsan magasabb értékeket figyeltünk meg, mint nőstényekben ($7,20 \pm 0,60$ vs $2,30 \pm 0,53$ pg/ml). Az eredményeket a 8. ábrán tüntettük fel.

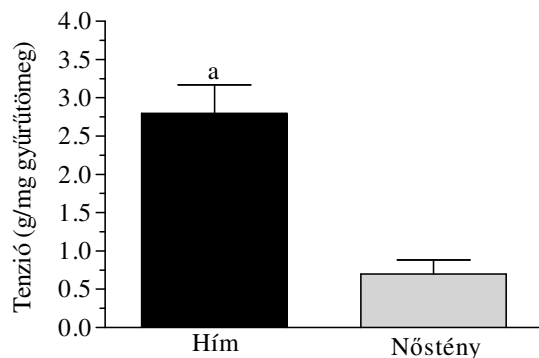


8. ábra: Hím és nőstény patkányok plazma AVP szintje (pg/ml)

A hímek (■) plazma AVP szintje jelentősen magasabb a nőstényekénél (□). Az adatokat átlag \pm S.E.M.-ben adtuk meg. Minden csoport legalább 10 állatból állt, a statisztikai szignifikancia $^a p < 0,05$ volt a nőstényekkel összehasonlítva.

7.1.2. AVP által kiváltott aortagyűrű-kontrakció hím és nőstény patkányokban

A túlélő patkány aortagyűrű-kontrakció eredményeket a 9. ábrán mutatjuk be. Az AVP (2.0 μ g/ml) hatására bekövetkező vazokonstriktió jóval magasabb hímekben, mint nőstényekben ($2,80 \pm 0,37$ vs $0,70 \pm 0,18$ g/mg gyűrűtömeg).

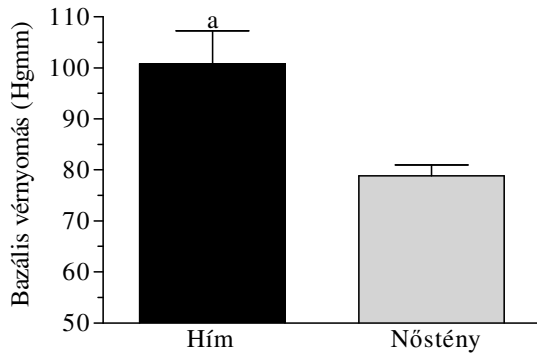


9. ábra: AVP által indukált aortagyűrű-kontrakció (g/mg gyűrűtömeg) hím és nőstény patkányokban

A hímekben (■) lényegesen magasabb aortagyűrű-kontrakciót tapasztaltunk, mint nőstényekben (□). Az adatok átlag \pm S.E.M.-ben vannak feltüntetve, $n=7-11$ állat minden csoportban, a statisztikai szignificancia $^a p < 0,05$ a nőstény csoporthoz képest.

7.1.3. Hím és nőstény patkányok bazális vérnyomása

Az arteria carotisban mért bazális vérnyomás értékek az 10. ábrán láthatók. A hím állatok értékei jóval magasabbak a nőstényekéinél ($100,80 \pm 6,49$ vs $78,80 \pm 2,19$ Hgmm).



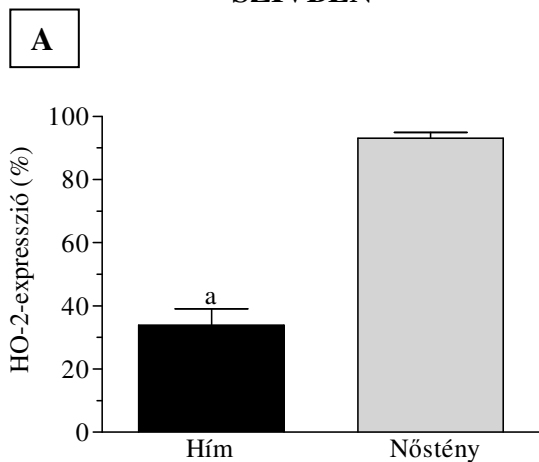
10. ábra: Hím és nőstény állatok bazális vérnyomás értékei (Hgmm)

A hímek bazális vérnyomása (■) a nőstényekénél (□) magasabb értéket mutat. Az adatok átlag \pm S.E.M.-ben lettek megadva, csoportonként legalább 10 állat felhasználásával, a statisztikai szignifikancia ^a $p < 0,05$ a nőstény csoporthoz viszonyítva.

7.1.4. Szöveti HO-2- és HO-1-expresszió hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában és aortájában

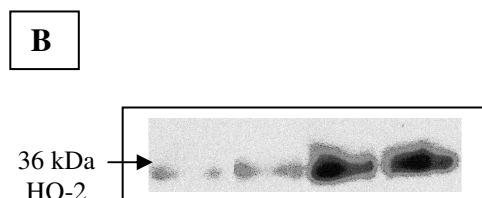
A HO-1 és HO-2 fehérjék szöveti expresszióját hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában és aortájában Western blot módszerrel vizsgáltuk. Az 11. (A, B) és 12. (A, B) ábrákon látható, hogy a konstitutív HO-2 izoenzim szintje a hím állatok bal szívkamra és aorta abdominalis szöveteiben szignifikánsan alacsonyabb, mint a nőstények esetében (bal szívkamra: $33,86 \pm 5,16$ vs $93,14 \pm 1,79$ %; aorta abdominalis $44,14 \pm 3,11$ vs $87,29 \pm 4,03$ %). Az induktív izoenzim (HO-1) jelenlétét szintén kimutattuk. Az 13. (A, B) és 14. (A, B) azt mutatják, hogy hímekben a HO-1 enzim expressziója, hasonlóan a HO-2-hez, szintén jelentősen alulmarad a nőstényekhez viszonyítva (bal szívkamra: $39,0 \pm 5,11$ vs $87,43 \pm 3,02$ %; aorta abdominalis: $40,29 \pm 3,79$ vs $85,29 \pm 5,13$ %). A nőstény patkányokat az ösztrusz fázisuk reggelén vizsgáltuk.

HO-2 SZÍVBEN

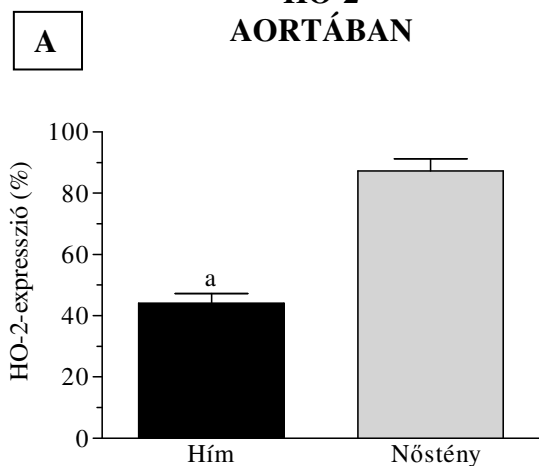


11. ábra: HO-2-expresszió (%-ban) hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, a maximális expressziót 100 %-nak vettük). A HO-2 enzim expressziója magasabb nőstényekben (■), mint hímekben (■). A „B” részen a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a nőstény csoporthoz viszonyítva.

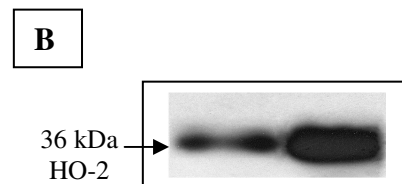


HO-2 AORTÁBAN

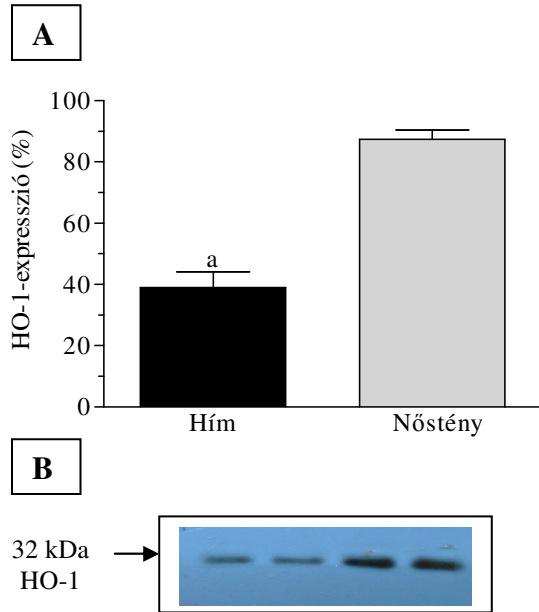


12. ábra: HO-2-expresszió (%-ban) hím és nőstény patkányok aorta abdominalisában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, 100 %-nak vettük a maximális expressziót). A HO-2 enzim expressziója magasabbnak bizonyult nőstények (■), mint hímek (■) esetében. A „B” részen a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a nőstény csoporttal összevetve.



HO-1 SZÍVBEN

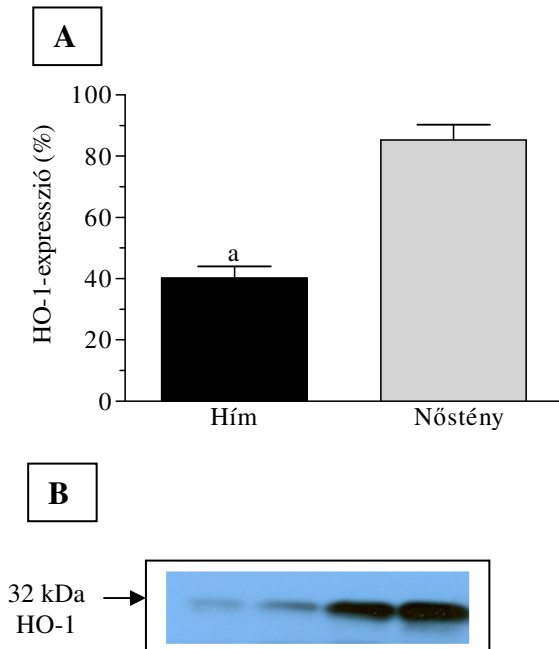


13. ábra: HO-1-expresszió (%-ban) hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag \pm S.E.M. %-ban, A maximális expressziót 100 %-nak vettük). Magasabb HO-1-expressziót mutattunk ki nőstények állatokban (■), mint hímekben (■).

A „B” részén a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a nőstény csoporthoz képest.

HO-1 AORTÁBAN



14. ábra: HO-1-expresszió (%-ban) hím és nőstény patkányok aorta abdominalisában

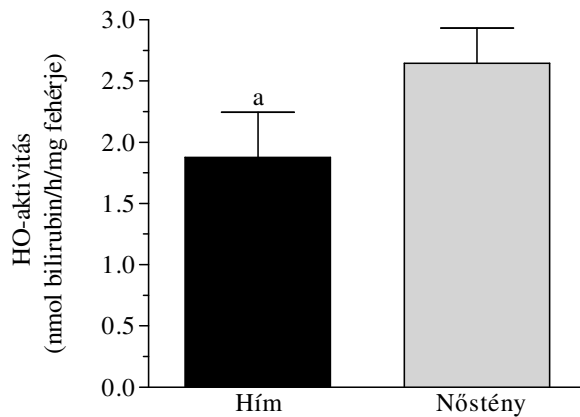
Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag \pm S.E.M. %-ban, 100 %-nak a maximális expressziót tekintettük). A HO-1 enzim expressziója magasabb nőstényekben (■), mint hímekben (■).

A „B” részén a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a nőstény csoporttal összehasonlítva.

7.1.5. HO-aktivitás hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában és aortájában

A HO-aktivásra a képződött bilirubin mennyiségéből következtettünk. A kapott eredmények megerősítették a HO-2 és HO-1 izoenzim esetében tapasztaltakat, ugyanis a nőstény állatokban a hímekhez képest szignifikánsan magasabb HO-aktivitást figyeltünk meg a bal szívkamrában (15. ábra) és az aorta abdominalisban (16. ábra) egyaránt (szív: $2,65 \pm 0,29$ vs $1,88 \pm 0,37$ nmol bilirubin/h/mg fehérje; aorta: $9,71 \pm 2,20$ vs $5,05 \pm 0,80$ nmol bilirubin/h/mg fehérje). A nőstényeket az ösztrosz fázisuk reggelén vizsgáltuk.

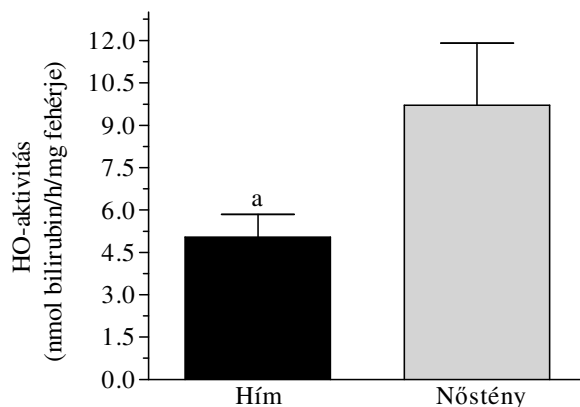
SZÍV



15. ábra: HO-aktivitás (nmol/bilirubin/h/mg fehérje) hím és nőstény patkányok bal szívkamrájában

A hím (■) és nőstény csoport (□) eredményeit nmol bilirubin/h/mg fehérjeként fejeztük ki, és átlag \pm S.E.M.-ként tüntettük fel ($n = 9-11$), ^a $p < 0,05$ a nőstényekkel összehasonlítva.

AORTA

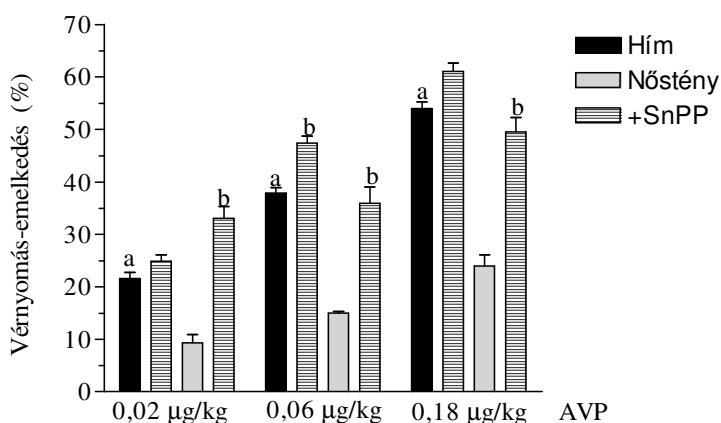


16. ábra: HO-aktivitás (nmol/bilirubin/h/mg fehérje) hím és nőstény patkányok aortájában

A hím (■) és nőstény csoport (□) eredményeit nmol bilirubin/h/mg fehérjeként fejeztük ki, és átlag \pm S.E.M.-ként adtuk meg ($n = 10-11$), ^a $p < 0,05$ a nőstényekkel összevetve.

7.1.6. HO-gátlás hatása hím és nőtény patkányok AVP-re adott vérnyomásválaszára

A jobb oldali arteria carotisban mért vérnyomás intravénásan adott AVP (0,02-0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) hatására bekövetkező változását követtük nyomon hím és nőtény patkányokban. Az AVP dózisfüggően növelte az artériás vérnyomást mind a hím, mind a nőtény állatokban, de a hímekben a vérnyomás-emelkedés szignifikánsan magasabb volt a nőtényekhez képest ($21,60 \pm 1,19$ - $54,0 \pm 1,29$ % vs $9,30 \pm 1,62$ - $24,0 \pm 2,12$ %). A HO enzimrendszer gátlása (SnPP, 30,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 24 illetve 1 órával a mérés előtt) mindkét csoportban a vérnyomás-emelkedés növekedéséhez vezetett (hím: $24,90 \pm 1,21$ - $61,10 \pm 1,53$ %; nőtény: $33,10 \pm 2,23$ - $49,50 \pm 2,76$ %). Az eredmények az 17. ábrán láthatók.



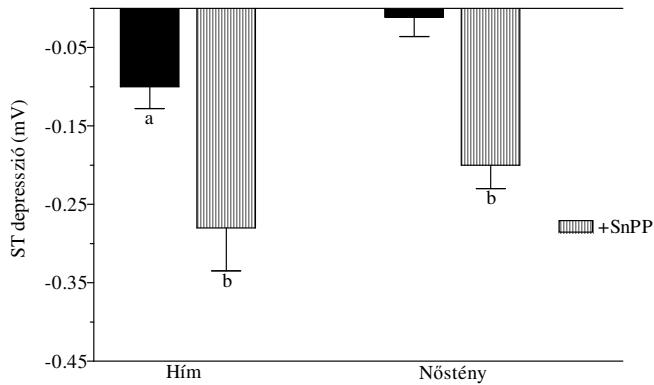
17. ábra: HO-gátlás hatása hím és nőtény patkányok AVP-re adott vérnyomásválaszára

AVP hatására bekövetkező jóval nagyobb vérnyomás-emelkedést tapasztaltunk a hímekben (■), mint a nőtény állatokban (□). A HO enzimrendszer SnPP-vel történő gátlása (▨) megnövelte az AVP által indukált vérnyomás-emelkedés mértékét mindkét nemben. Az eredmények %-ban vannak kifejezve, és átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel őket ($n = 10-11$), ^a $p < 0,05$ a nőtényekhez viszonyítva. ^b $p < 0,05$ szignifikáns különbséget jelöl az SnPP kezeletlen és az SnPP-vel kezelt csoportok között.

7.1.7. HO-gátlás hatása hím és nőtény patkányok szívizskémiájára (ST depresszió)

Intravénásan epinefrin- (A; 10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), majd 30 s elteltével fentolamin (P; 15,0 mg/kg)-kezelést követően az ST szegmens változásait standard felszíni ECG II-vel tanulmányoztuk hím és nőtény patkányokban. A beavatkozás csak a hím állatoknál okozott szignifikáns ST szegmens depressziót ($-0,10 \pm 0,028$ mV), a nőtényekben ($-0,0012 \pm 0,025$ mV) ezt nem tapasztaltuk. SnPP-

vel történő előkezelés (30,0 µg/kg, 24 illetve 1 órával a mérés előtt) a nőtény patkányokban is ST depressziót eredményezett (-0,20±0,030 mV), míg a hímekben növelte a változás mértékét (-0,28±0,055 mV). Az eredmények az 18. ábrán vannak feltüntetve.

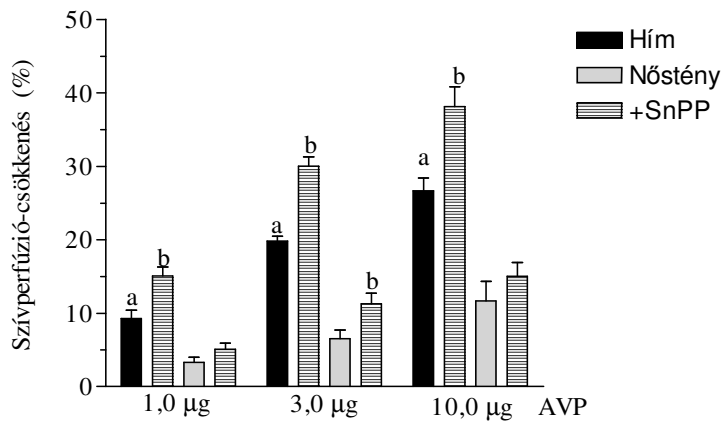


18. ábra: HO-inhibitor ón-protoporfirin (SnPP) hatása az ST szegmens változásaira

Az SnPP kezelés (▨) mind hímek, mind nőtények esetében jelentősen növelte az ST szegmens változását a nem kezelt csoporthoz (■) viszonyítva. Az eredmények mV-ban értendők, és átlag ± S.E.M.-ként vannak megadva, (n = 10), ^ap < 0,05 a nőtény csoporttal összehasonlítva. ^bp < 0,05 szignifikáns különbséget mutat az SnPP-vel kezelt és a kezeletlen csoportok között.

7.1.8. HO-gátlás hatása hím és nőtény patkányok AVP-re adott izolált szív perfúzióra

Az izolált szív perfúzióját Langendorff szerint vizsgáltuk. Az inkubációs közeghez adott AVP (1,0-10,0 µg) hímekben és nőtényekben is a perfúzió csökkenését okozta, és a hatás dózisfüggőnek bizonyult mindkét vizsgált csoportban. Hímekben a csökkenés szignifikánsan erőteljesebb volt (9,30±1,11-26,70±1,71 %), mint a nőtények között (3,30±0,72-11,70±2,61 %). A HO enzimrendszer SnPP-vel történő gátlása mindkét csoportban a hatás erősödéséhez vezetett (hím: 15,10±1,88-38,10±2,72 %; nőtény: 5,10±0,83-15,00±1,90 %). Az eredményeket az 19. ábra mutatja.



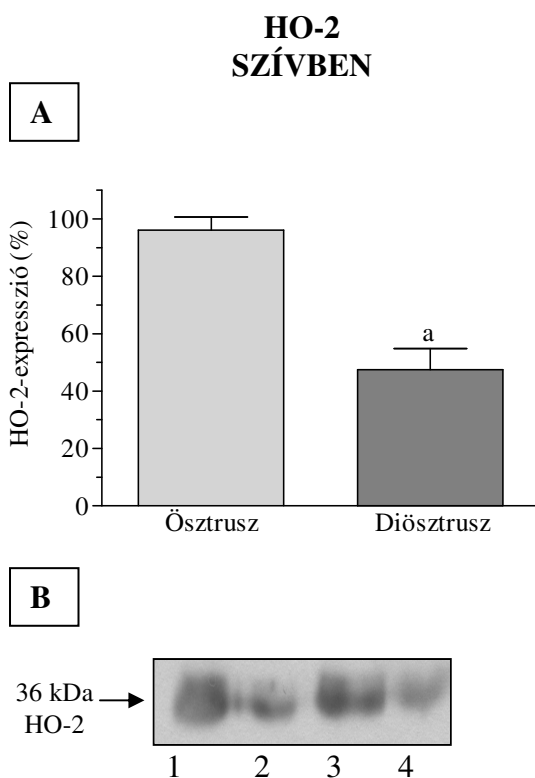
19. ábra: HO-gátlás hatása az izolált szív perfúziójára

Hímek esetében (■) jóval jelentősebb AVP-indukálta szívperfúzió-csökkenést tapasztaltunk, mint a nőstény állatok között (□). Az SnPP-vel történő HO gátlás (▨) erősítette a hatást hímek és nőstények között egyaránt. Az eredmények %-ban értendők, és átlag ± S.E.M.-ként vannak feltüntetve, (n = 9-10), ^ap < 0,05 a nőstény csoporttal összevetve. ^bp < 0,05 szignifikáns különbséget mutat az SnPP-kezelt és a kontroll csoportok között.

7.2. Ösztrusz ciklus

7.2.1. HO-2- és HO-1-expresszió nőstény patkányok bal szívkamrájában és aorta abdominalisában különböző E₂-telítettségi állapotokban

A HO-2 és HO-1 fehérjék szöveti expresszióját nőstény patkányok bal szívkamrájában és aorta abdominalisában Western blot módszerrel vizsgáltuk. A állatokat különböző E₂-telítettségi állapotokban tanulmányoztuk. Az E₂-szint maximumát a proösztrozban és az ösztrusz reggelén éri el és a diösztroz fázisban a legalacsonyabb. Az 20. (A, B) ábra azt mutatja, hogy a konstitutív izoenzim (HO-2) szintje az ösztrusz fázisban levő nőstények bal szívkamrájában szignifikánsan magasabb, mint a diösztroz fázisban levő állatok esetében (96,12±4,46 vs 47,44±7,47 %). Az enzim induktív formájának expresszióját szintén kimutattuk. Ahogy az a 21. (A, B) ábrán látható, a HO-2-hez hasonlóan a HO-1 enzim szintén lényegesen magasabb szinten expresszáldott az ösztrusz fázisú nőstények bal szívkamrájában, mint a diösztroz fázisúakéban (94,66±3,46 vs 23,46±8,99 %) (22. ábra). Az aorta abdominalisban tapasztalt eredmények az előzőekkel ellentétesek: A HO-2 és a HO-1 expressziója is alacsonyabb szintű az ösztrusz fázisban, mint a diösztrozban (HO-2: 49,44±7,41 vs 94,34±4,12 %; HO-1: 54,77±8,23 vs 95,45±3,17 %) (23. ábra)



20. ábra: Szöveti HO-2-expresszió (%-ban) különböző E₂-telítettségi nőstény patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Az ösztrusz fázisban levő nőstényekben (□) magasabb HO-2-expressziót tapasztaltunk, mint a diösztroz fázisúak esetén (■).

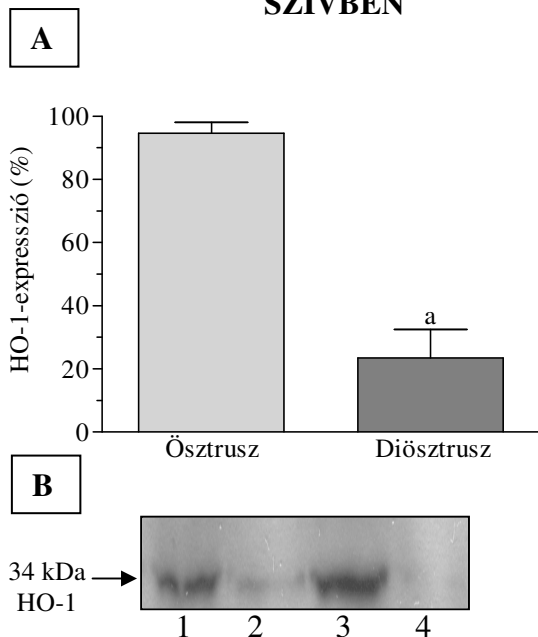
A „B” részen a reprezentatív kép látható.

1,3: ösztrusz fázisú nőstények HO-2-szintje

2,4 diösztroz fázisú nőstények HO-2-szintje

n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 az ösztrusz fázisú csoporttal összevetve.

HO-1 SZÍVBEN

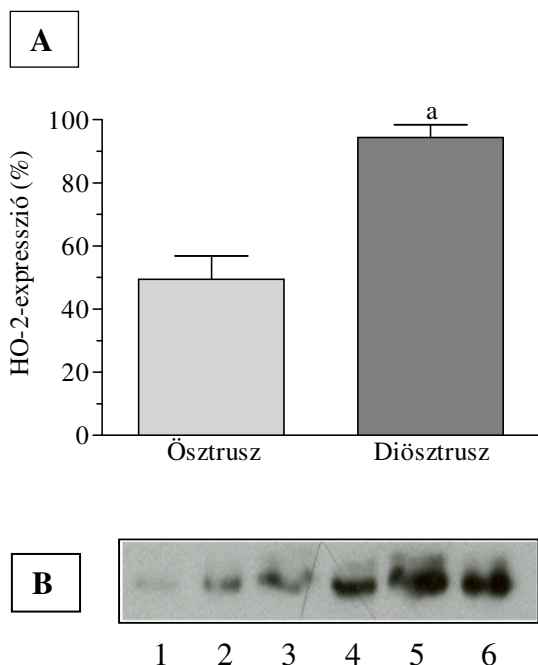


21. ábra: Szöveti HO-1-expresszió (%-ban) különböző E₂-telítettségű nőstény patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Az ösztrozus fázisban levő nőstényekben (□) kifejezettebb volt a HO-1-expresszió, mint diösztrozus fázisban (■).

A „B” részén a reprezentatív kép látható.
1,3: ösztrozus fázisú nőstények HO-1-szintje
2,4 diösztrozus fázisú nőstények HO-1-szintje
n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 az ösztrozus fázisú csoporttal összehasonlítva.

HO-2 AORTÁBAN

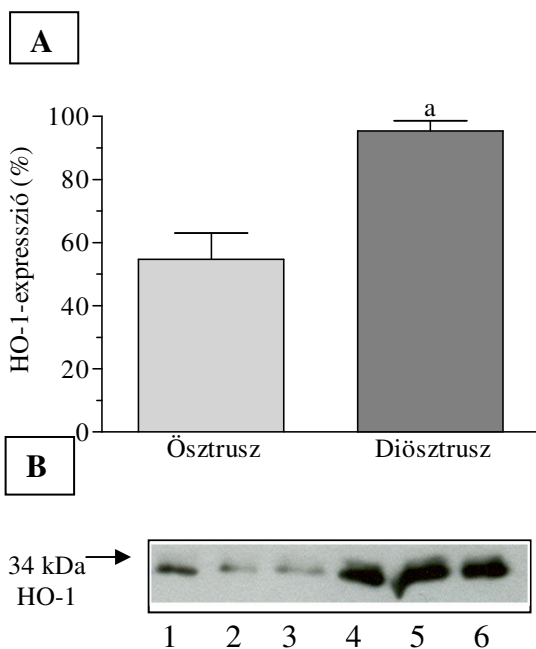


22. ábra: Szöveti HO-2-expresszió (%-ban) különböző E₂-telítettségű nőstény patkányok aortájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Az ösztrozus fázisban levő nőstényekben (□) alacsonyabb szintű HO-2-expressziót figyeltünk meg, mint diösztrozus fázisban (■).

A „B” részén a reprezentatív kép látható.
1, 2, 3: ösztrozus fázisú nőstények HO-2-szintje
4, 5, 6: diösztrozus fázisú nőstények HO-2-szintje
n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 az ösztrozus fázisú csoporthoz viszonyítva.

HO-1 AORTÁBAN



23. ábra: Szöveti HO-1-expresszió (%-ban) különböző E₂-telítettségű nőstény patkányok aortájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Az ösztroz fázisú nőstényekben (□) alacsonyabb szintű HO-1-expressziót mutattunk ki, mint a diösztruz fázisban levők esetében (■).

A „B” részen a reprezentatív kép látható.

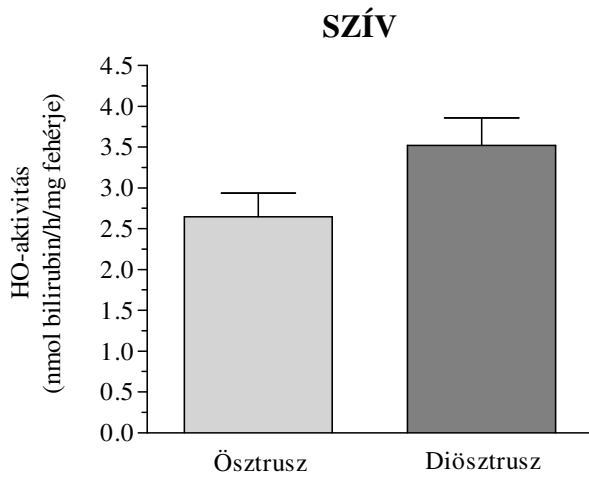
1, 2, 3: ösztroz fázisú nőstények HO-1-szintje

4, 5, 6: diösztruz fázisú nőstények HO-1-szintje

n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 az ösztroz fázisú állatokhoz viszonyítva.

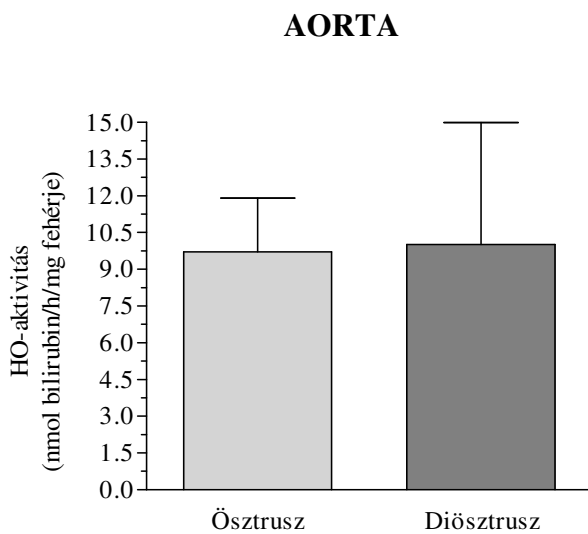
7.2.2. HO-aktivitás különböző E₂-telítettségű állapotokban levő nőstény patkányok bal szívkamrájában és aorta abdominalisában

A HO-aktivitást a képződött bilirubin mennyisége alapján határoztuk meg. Nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a proösztroz/ösztroz fázisú nőstényekből és a diösztruz fázisban levőkből származó bal szívkamra és aorta abdominalis szövetek között (bal szívkamra: 2,65±0,29 vs 3,52±0,34 nmol bilirubin/h/mg fehérje; aorta abdominalis: 9,71±2,20 vs 10,02±4,97 nmol bilirubin/h/mg fehérje).



24. ábra: Különböző E₂-telítettségi állapotok hatása a szívizom HO-aktivására (nmol/bilirubin/h/mg fehérje)

Tendenciálisan magasabb HO-aktivitást figyeltünk meg a diösztroz fázisú nőstényekben (■), mint az ösztroz fázisúak esetében (□), de a különbség nem volt szignifikáns. Az eredmények nmol bilirubin/h/mg fehérje formában vannak megadva, és átlag ± S.E.M.-ben tüntettük fel őket, (n = 9-10).



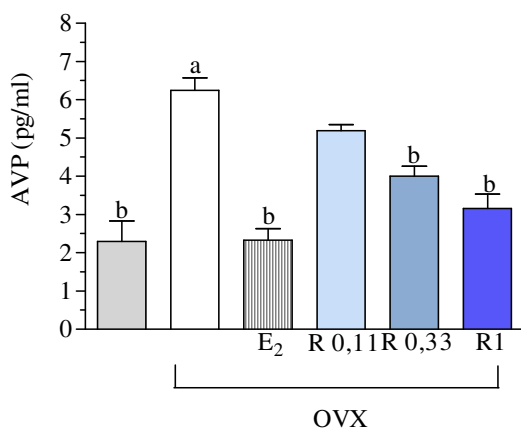
25. ábra: Különböző E₂-telítettségi állapotok hatása a aorta abdominalis HO-aktivására (nmol/bilirubin/h/mg fehérje)

Nem tapasztaltunk különbséget HO-aktivásban a diösztroz (■) és a proösztroz/ösztroz fázisú nőstények (□) között. Az eredményeket nmol bilirubin/h/mg fehérje formában fejeztük ki, és átlag ± S.E.M.-ben tüntettük fel őket, (n = 9-10).

7.3. Ovariectomia (OVX) és E_2 - illetve raloxifenkezelés

7.3.1. Az E_2 és raloxifen hatása OVX patkányok plazma AVP szintjére

Az OVX állatokban szignifikánsan magasabb plazma AVP szintet mutattunk ki, mint nőstényekben ($6,25 \pm 0,33$ vs $2,3 \pm 0,53$ pg/ml) (26. ábra). Három különböző dózisu raloxifennel (0,11 mg/kg; 0,33 mg/kg; 1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($5,20 \pm 1,55$ pg/ml; $4,00 \pm 0,26$ pg/ml; $3,16 \pm 0,38$ pg/ml) vagy ösztradiollal (0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($2,33 \pm 0,30$ pg/ml) történő kezelés meggátolta a plazma AVP szintjének növekedését OVX patkányokban. A raloxifenkezelés a plazma AVP szintjét dóziszfüggően csökkentette.



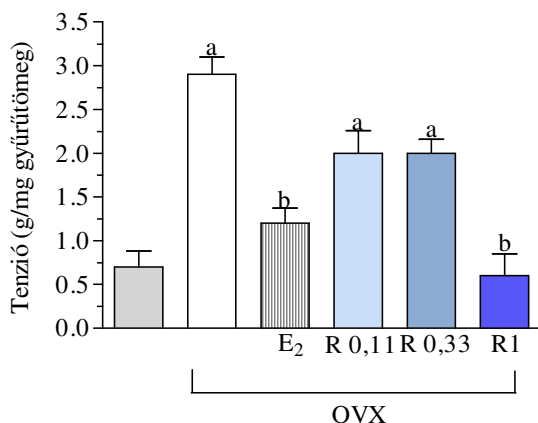
26. ábra: Ösztradiol- és raloxifenkezelés hatása az OVX nőstény patkányok plazma AVP szintjére (pg/ml)

A kezeletlen OVX állatok plazma AVP szintje megnövekedett (□), míg 3 különböző dózisu raloxifennel (R0,11 □, R0,33 ■, R1 ■), vagy ösztradiollal (E_2 ▨), történő kezelés meggátolta az AVP szint növekedését. Az adatok pg/ml-ben értendők, és átlag ± S.E.M.-ként vannak feltüntetve. Minden csoport legalább 10 állatot tartalmazott, a statisztikai szignifikancia ^a $p < 0,05$ a nőstényekhez, és ^b $p < 0,05$ kezeletlen OVX csoporthoz viszonyítva.

7.3.2. Az E_2 és raloxifen hatása az OVX patkányok AVP-indukálta aortagyűrű-kontrakciójára

A túlélő patkány aortagyűrű-kontrakció eredmények a 27. ábrán vannak feltüntetve. Az AVP hatására bekövetkező vazokonstrikció jóval nagyobb mértékűnek bizonyult az OVX nőstényekben, mint a nem operált állatokban ($2,90 \pm 0,20$ vs $0,70 \pm 0,18$ g/mg aortagyűrű-tömeg). Kisebb dózisokban adott raloxifen (0,11 mg/kg és 0,33 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($2,00 \pm 0,26$ g/mg aortagyűrű-tömeg és $2,00 \pm 0,16$ g/mg aortagyűrű-tömeg) enyhén csökkentette az AVP-indukálta aortagyűrű-kontrakciót OVX állatokban, de a tenzió még így is magasabb volt, mint a nem operált kontroll csoport esetében. Nagyobb dózisu raloxifen (1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($0,60 \pm 0,25$ g/mg aortagyűrű-tömeg) illetve ösztradiol

(0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($1,20 \pm 0,17$ g/mg aortagyűrű-tömeg) viszont meggátolta OVX nőstényekben az AVP hatására bekövetkező aortagyűrű-kontrakciót (27. ábra).



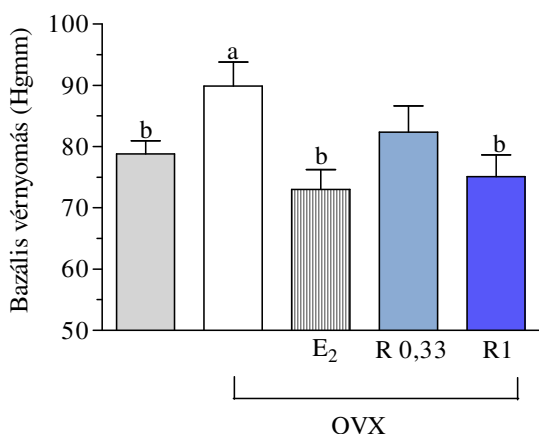
27. ábra: Ösztradiol- és raloxifenkezelés hatása az AVP-indukálta túlélő aortagyűrű-kontrakcióra (g/mg gyűrűtömeg) OVX patkányokban

A vazokonstriktió a kezeletlen OVX csoportban (□) volt a legnagyobb mértékű. Három különböző dózisu raloxifen (R0,11: □, R0,33: ■, R1: ■) ill. ösztradiol (E₂ ▨) meggátolta az AVP-indukálta aortagyűrű-kontrakciót OVX állatokban.

Az adatok átlag ± S.E.M.-ként vannak megadva, n=11-12 minden csoportban, a statisztikai szignifikancia ^ap<0,05 a kontroll nőstényekhez, és ^bp<0,05 kezeletlen OVX állatokhoz viszonyítva.

7.3.3. Ösztradiol és raloxifen hatása OVX patkányok bazális vérnyomására

A vérnyomás változásai az 28. ábrán láthatók. A kezeletlen OVX nőstényekben magasabb vérnyomást figyeltünk meg ($89,89 \pm 3,93$ Hgmm), míg a raloxifennel (0,33 mg/kg, ill. 1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($82,37 \pm 4,20$ ill. $75,11 \pm 3,54$ Hgmm), vagy az ösztradiollal (0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($73,03 \pm 3,20$ Hgmm) történő kezelés a vérnyomást a kontroll nőstények szintjére állította vissza.



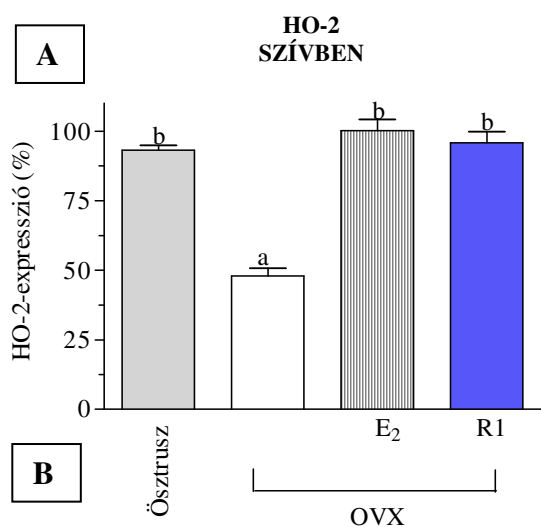
28. ábra: Ösztradiol- és raloxifenkezelés hatása OVX patkányok vérnyomására (Hgmm)

A kezeletlen OVX csoportban (□) magasabb vérnyomást mértünk, de az érték a kontroll csoport szintjére állt vissza az ösztradiol- (▨) ill. mindkét dózisu raloxifenkezelés (R 0,33 ■; R1 ■) hatására.

Az adatok átlag ± S.E.M.-ként vannak feltüntetve, minden csoport 12-14 állatból állt, a statisztikai szignifikancia ^ap<0,05 a kontroll nőstényekhez, és ^bp<0,05 kezeletlen OVX csoporthoz viszonyítva.

7.3.4. Raloxifen és ösztradiol hatása a HO-2 és a HO-1 expressziójára OVX patkányok bal szívkamrájában

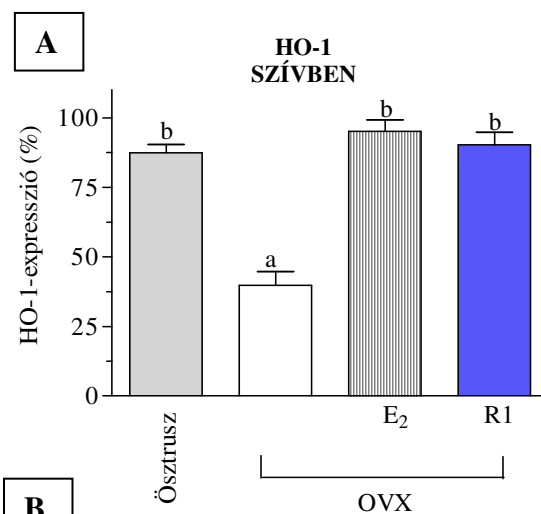
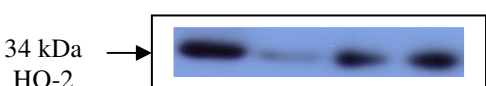
A HO-2 és HO-1 fehérjék mennyiségét Western-blot analízissel határoztuk meg. Eredményeink szerint az OVX jelentősen lecsökkentette a HO enzimek expresszióját a szívben (HO-2: $48,0 \pm 2,76$ %; HO-1: $39,86 \pm 4,79$ %), míg E₂- (0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) (HO-2: $100,14 \pm 4,02$ %; HO-1: $95,14 \pm 4,11$ %) illetve raloxifenkezelés (1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) (HO-2: $95,86 \pm 4,03$ %; HO-1: $90,29 \pm 4,43$ %) hatására az expresszió az nőstényekben tapasztalt szintre állt vissza. Az eredményeket az 29. (A;B) és 30. (A;B) ábra szemlélteti.



29. ábra: OVX hatása a HO-2 expressziójára (%) szívben

Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag \pm S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Az intakt, ösztroz fázisú nőstényekben (□), és az ösztradiol- (E₂ ▨) ill. raloxifen-kezelt (R1 ■) csoportokban magasabb HO-2-expressziót figyeltünk meg, mint a kezeletlen, OVX állatok esetében (□).

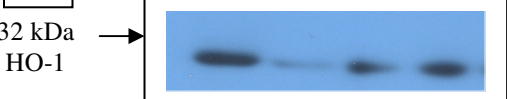
A „B” részén a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a kontroll nőstény; és ^bp<0,001 a kezeletlen OVX csoporthoz viszonyítva.



30. ábra: OVX hatása a HO-1 expressziójára (%) szívben

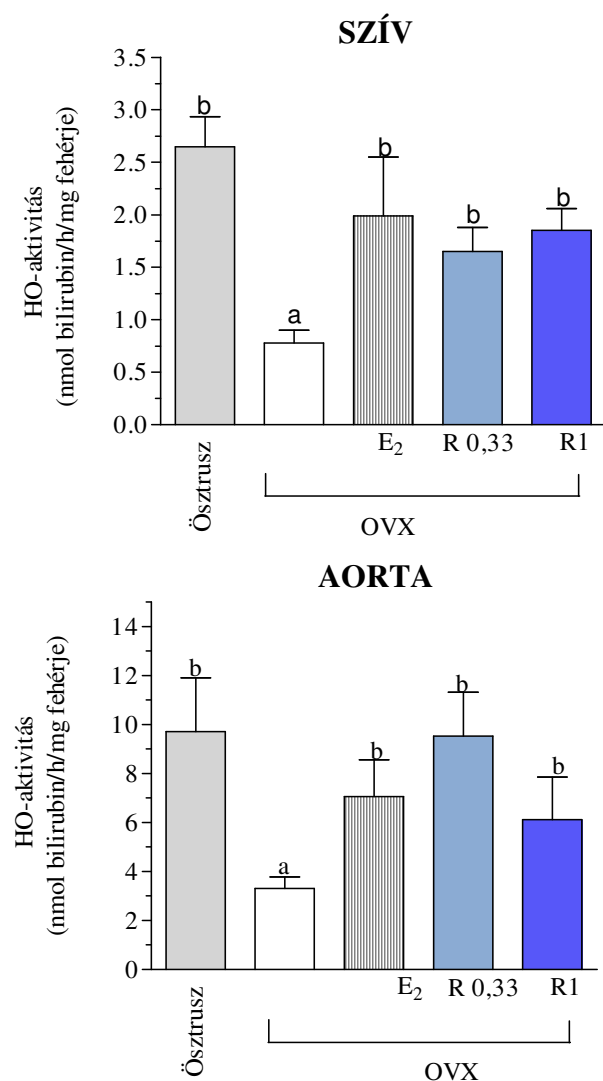
Az ábra „A” része a denzitometrikus értéket mutatja (átlag \pm S.E.M. %-ban, 100% a maximális expressziót jelenti). Magasabb HO-1-expressziót mutattunk ki az ösztroz fázisú nőstény állatokban (□), és az ösztradiol- (E₂ ▨) ill. raloxifen-kezelt (R1 ■) csoportokban, mint a kezeletlen, OVX nőstényekben (□).

A „B” részén a reprezentatív kép látható. n=7, statisztikai szignifikancia: ^ap<0,001 a kontroll nőstény; és ^bp<0,001 a kezeletlen OVX csoporttal összehasonlítva.



7.3.5. Raloxifen és ösztradiol HO-aktivásra gyakorolt hatása az OVX patkányok bal szívkamrájában és aortájában

A HO aktivitást a képződött bilirubin mennyiségéből határoztuk meg. OVX következtében az enzimaktivitás jelentősen lecsökkent a bal szívkamrában ($0,78 \pm 0,12$ nmol bilirubin/h/mg fehérje) és az aorta abdominalisban ($3,31 \pm 0,46$ nmol bilirubin/h/mg fehérje). Ezzel szemben E_2 -nel (ösztradiol: $0,10$ mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) (bal szívkamra: $1,99 \pm 0,56$ nmol bilirubin/h/mg fehérje; aorta abdominalis: $7,06 \pm 1,51$ nmol bilirubin/h/mg fehérje) vagy mindkét dózisu raloxifennel ($0,33$ ill. $1,0$ mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) (szív: $1,65 \pm 0,23$ nmol bilirubin/h/mg fehérje, aorta: $9,54 \pm 1,78$ nmol bilirubin/h/mg fehérje; ill. szív: $1,85 \pm 0,21$ nmol bilirubin/h/mg fehérje, aorta: $6,12 \pm 1,74$ nmol bilirubin/h/mg fehérje) történő kezelés hatására az OVX állatok szív bal kamrájában és aortájában a HO-aktivitás a nőstényekben tapasztalt szintre tért vissza. Az eredmények a 31. és 32. ábrán láthatóak.



31. ábra: Raloxifen- és ösztradiolkezelés hatása a HO-aktivításra (nmol/bilirubin/h/mg fehérje) OVX patkányok szívizomszövetében

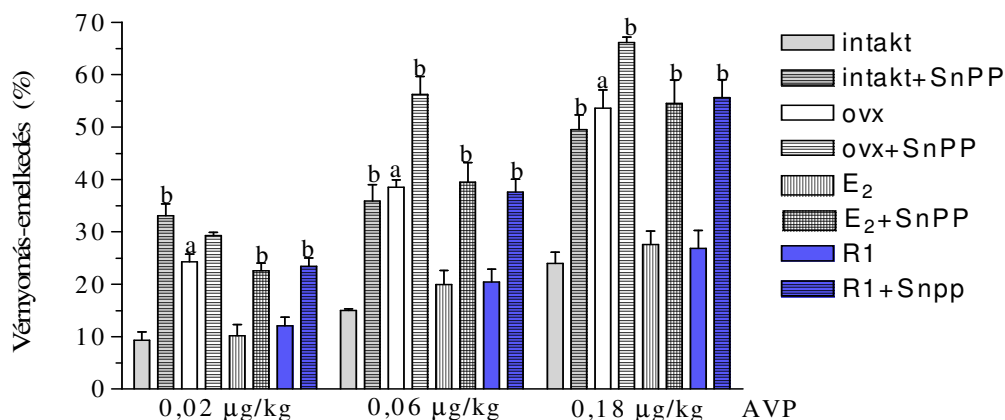
Az OVX állatokban (□) csökkent HO-aktivitást tapasztaltunk, míg mindkét dózisu raloxifennel (R0,33: ■ ; R1: ■) ill. ösztradiollal (E_2 ▨) történő kezelés növelte a HO-aktivitást. Az eredmények nmol bilirubin/h/mg fehérjében értendők, és átlag \pm S.E.M.-ként vannak feltüntetve ($n = 9-10$). ^a $p < 0,05$ az ösztrozozos nőstényekhez, és ^b $p < 0,05$ az OVX csoporttal összehasonlítva.

32. ábra: Raloxifen- és ösztradiolkezelés hatása a HO-aktivításra (nmol/bilirubin/h/mg fehérje) OVX patkányok aortaszövetében

A kezeletlen OVX nőstényekben (□) csökkent HO-aktivitást figyeltünk meg, de az érték növekedett mindkét dózisu raloxifennel (R0,33: ■; R1: ■), ill. ösztradiollal (E_2 ▨) történő kezelés hatására. Az eredmények nmol bilirubin/h/mg fehérjében értendők, és átlag \pm S.E.M.-ként vannak feltüntetve ($n = 8-9$), ^a $p < 0,05$ az ösztrozozos nőstényekhez, és ^b $p < 0,05$ az OVX csoporttal összehasonlítva.

7.3.6. HO-gátlás hatása az AVP-re adott válszként kialakuló vérnyomásra

Fentolaminnal (fentolamin: P, 10,0 mg/kg i.p.) kezelt nőstény patkányok jobb oldali arteria carotisban mért vérnyomásában dóziszfüggő növekedést figyeltünk meg intravénásan adott AVP (0,02-0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) hatására OVX és intakt állatokban egyaránt. Az OVX csoportban a vérnyomás-emelkedés szignifikánsan nagyobb mértékűnek bizonyult ($24,3 \pm 1,42$ - $53,6 \pm 3,48$ %), mint az intakt nőstényekben ($9,3 \pm 1,62$ - $24,0 \pm 2,12$ %). E_2 -kezelés (Ösztradiol, 0,10 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) után a tapasztalt fokozott vérnyomásválasz elmaradt ($10,20 \pm 2,07$ - $27,60 \pm 2,50$ %), raloxifen (1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) hatására pedig enyhült az AVP-indukálta vérnyomás-emelkedés ($12,10 \pm 1,60$ - $26,80 \pm 3,45$ %) az OVX állatokban. A HO enzimrendszer gátlása szignifikáns növekedéshez vezetett minden vizsgált csoportban (intakt: $33,10 \pm 2,23$ - $49,50 \pm 2,76$ %; OVX: $29,30 \pm 0,56$ - $66,10 \pm 1,07$ %; ösztradiol-kezelt: $22,60 \pm 1,46$ - $54,50 \pm 4,50$ %; raloxifen-kezelt: $23,40 \pm 1,60$ - $55,60 \pm 3,45$ %). Az eredményeket az 33. ábrán tüntettük fel.

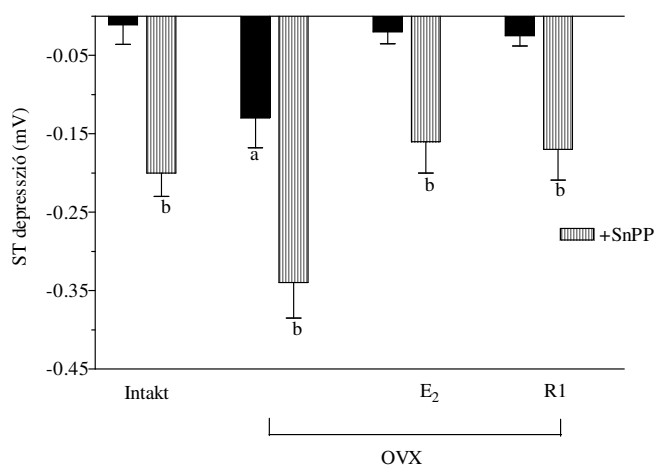


33. ábra: HO-gátlás hatása OVX patkányok artériás vérnyomására

Az OVX csoportban (□) jóval nagyobb mértékű AVP-indukálta vérnyomás-emelkedést tapasztaltunk, mint az intakt nőstényekben (■). Raloxifene (R1: ■) ill. 17- β -ösztradiol (E_2 : ▨) hatására az emelkedés enyhült. A HO enzimrendszer SnPP-vel történő gátlása (▨ ▨ ▨ ■) az AVP-re adott vérnyomásválasz erősödéséhez vezetett. Az adatok %-ban értendők, és átlag \pm S.E.M.-ként vannak kifejezve; (n = 6-8), ^ap < 0,05 a nőstényekhez viszonyítva. ^bp < 0,05 szignifikáns különbséget jelez az SnPP-kezelt és a kezeletlen csoportok között.

7.3.7. HO-gátlás szíviszkémiára gyakorolt hatása

Az ST szegmens változásait nőstény patkányokban lead II standard felszíni ECG-vel mértük intravénás epinefrinjekció (A: 10,0 µg/kg), majd 30 másodperccel később fentolamin (P: 15,0 mg/kg) beadását követően. A beavatkozás csak az OVX állatokban okozott szignifikáns ST szegmens depressziót ($-0,13 \pm 0,038$ mV), az intakt nőstényekben és az E₂- (0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) illetve raloxifen-kezelt (1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ovariectomizált csoportokban az ST szegmens depresszió nem jött létre. SnPP-vel történő előkezelés (30 µg/kg, 24 ill. 1 órával a mérés előtt) viszont ST depresszió létrejöttéhez vezetett az intakt ($-0,20 \pm 0,030$ mV) és az ösztradiollal ($-0,16 \pm 0,040$ mV), valamint raloxifennel ($-0,17 \pm 0,040$ mV) kezelt csoportokban is, továbbá növelte az ST depresszió mértékét az OVX nőstényekben (ST szegmens változás: $-0,34 \pm 0,045$ mV). Az adatokat az 34. ábrán mutatjuk be.



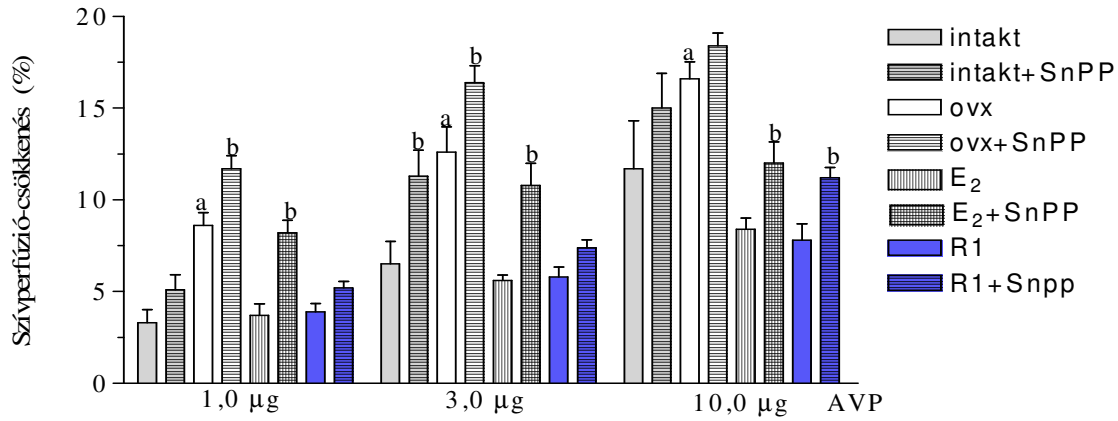
34. ábra: **HO-inhibitor ön-protoporfirin (SnPP) hatása az ST szegmens változásaira**

OVX kontroll csoport (■), SnPP hatása az ST szegmens változásaira (▨). Az eredmények mV-ban vannak megadva, és átlag ± S.E.M.-ként tüntettük fel őket, n = 10, ^ap < 0,05 a nőstényekkel összehasonlítva. ^bp < 0,05 szignifikáns különbséget jelez a kontroll és SnPP-kezelt csoportok között.

7.3.8. HO-gátlás hatása az izolált szív AVP-re adott perfúzióválaszára

Az atréiás vérnyomást Langendorff szerint mértük. Az AVP (1,0-10,0 µg) minden vizsgált csoportban dóziszfüggően befolyásolta a szívperfúziót. Az OVX nőstényekben az AVP szignifikánsan erősebb szívperfúzió-csökkenést okozott ($8,60 \pm 0,71$ - $16,6 \pm 0,91$ %), mint az intakt csoportban ($3,3 \pm 0,72$ - $11,7 \pm 2,61$ %). E₂-nel (Ösztradiol, 0,1 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($3,70 \pm 0,62$ - $8,40 \pm 0,61$ %) illetve raloxifennel (1,0 mg/kg, 2 héten át, per os, naponta egyszer) ($3,90 \pm 0,45$ - $7,80 \pm 0,90$ %) történő kezelést követően a szívperfúzió-csökkenés kisebb mértékű lett. A HO enzimrendszer gátlása (SnPP, 30 µg/kg, 24 ill. 1 órával a mérés előtt) minden csoportban a hatás szignifikáns erősödéséhez vezetett (intakt: $5,10 \pm 0,83$ - $15,0 \pm 1,90$ %; OVX kontroll: $11,70 \pm 0,70$ - $18,40 \pm 1,07$ %; ösztradiol-kezelt: $8,20 \pm 0,69$ - $12,60 \pm 1,16$ %; raloxifen-

kezelt: $5,20 \pm 0,35$ - $11,20 \pm 0,57$) Az eredmények az 35. ábrán láthatók.



35. ábra: HO-gátlás hatása OVX patkányok szívperfúziójára

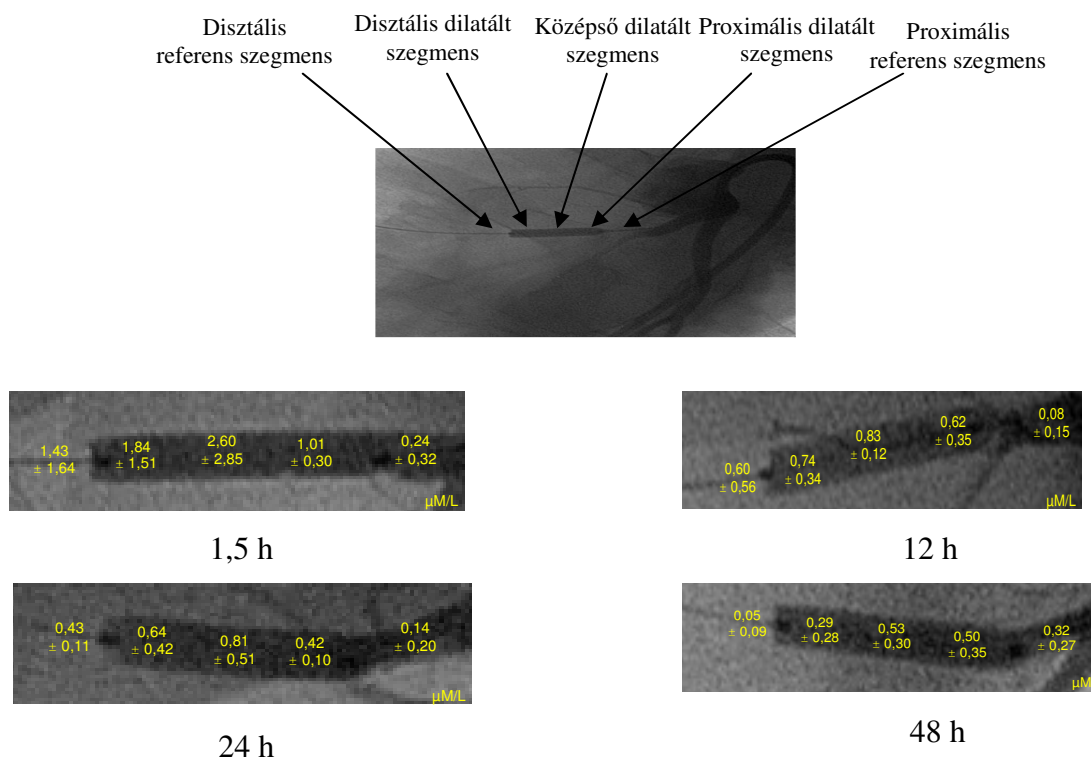
Az AVP-indukálta perfúziócsökkenés jóval kifejezettebb volt az OVX (□), mint az intakt nőstényekben (■). Raloxifen- (R1: ■) ill. 17β-ösztadiolkezelés (E₂ ▨) a szívperfúziót kontroll szintre állította vissza. SnPP-vel történő HO gátlás (▨ ▨ ▨ ▨) hatására kifejezettebb AVP-indukálta perfúzióválaszt figyeltünk meg. Az eredmények %-ban értendők, és átlag ± S.E.M.-ként vannak feltüntetve; n = 6-8, ^ap < 0,05 a nőstényekhez viszonyítva. ^bp < 0,05 szignifikáns különbséget mutat a kontroll és SnPP-kezelt csoportok között.

7.4. Paclitaxelkoncentráció sertés koronáriában

7.4.1. Paclitaxelszint sertés koronária artériájában paclitaxellel bevont Dior-ballonnal történő lokális hatóanyag-bejuttatást követően

A Dior-ballon egyes artériák és bifurkációk dilatációját célzó alkalmazása során és azt követően komplikációk nem léptek fel.

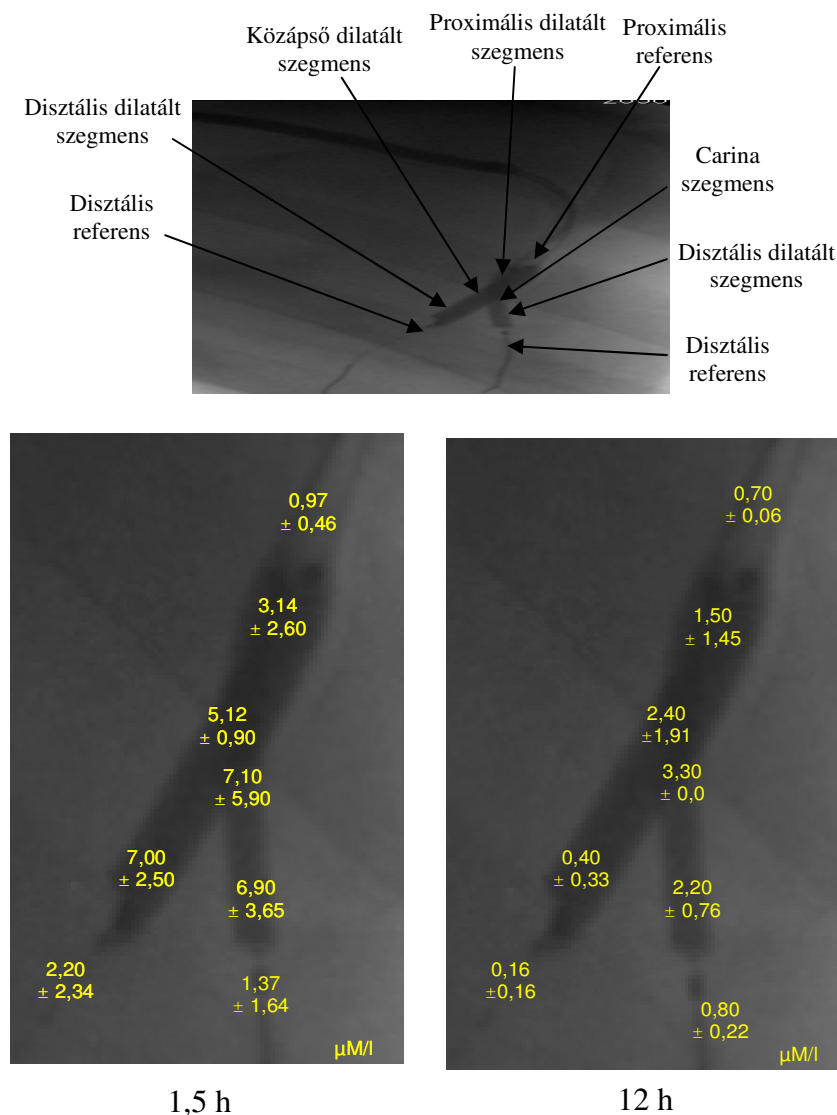
A beavatkozás után 1,5 órával az egyes dilatált artériákban $1,82 \pm 1,60$ $\mu\text{M/L}$ szöveti paclitaxelkoncentrációt mértünk, ami 12, 24 és 48 óra elteltével szignifikánsan lecsökkent ($0,73 \pm 0,27$ ($p=0,032$), $0,62 \pm 0,34$ és $0,44 \pm 0,31$ $\mu\text{M/L}$). A szegmensek proximális, középső és disztális részei közti paclitaxel-eloszlásban a LAD, LCx és RCA között nem tapasztaltunk különbséget, a hatóanyag szöveti koncentrációja a dilatált szegmensek középső részén volt a legmagasabb. A referencia szegmensek átlagos paclitaxelkoncentrációja fokozatosan csökkent $0,84 \pm 0,99$ -ről $0,34 \pm 0,36$ $\mu\text{M/L}$ -re ($p=0,09$), később pedig $0,28 \pm 0,16$ és $0,19 \pm 0,18$ $\mu\text{M/L}$ -re (1,5, 12, 24 és 48 órával a beavatkozás után) (36. ábra).



36. ábra: A Dior-ballon-infláció hatása a paclitaxelkoncentrációra a koronária artériákban

Az eredmények $\mu\text{M/ml}$ -ben értendők, és átlag \pm S.D.-ként vannak feltüntetve.

A bifurkációs intervenció $5,10 \pm 1,80 \mu\text{M/L}$ szöveti paclitaxelkoncentrációt eredményezett a főágban, ami 12 óra elteltével $1,41 \pm 1,23 \mu\text{M/L}$ -re csökkent ($p=0,004$). A bifurkációs oldalágban a paclitaxel szöveti koncentrációja $7,00 \pm 4,80 \mu\text{M/L}$ volt 1,5 órával a dilatáció után, ami $2,72 \pm 0,40 \mu\text{M/L}$ -re csökkent ($p=0,034$). A legmagasabb paclitaxelkoncentrációt az oldalág és a főág interszekciós pontjában mértük, ami a főág disztális része felé haladva csökkent (38. ábra). A referenciaszegmensekben hasonló paclitaxelkoncentrációt figyeltünk meg, mint az egyes szegmensdilatációban. A perifériás vérben 10, 20, 30 perccel, illetve 1, 2, 12, 24 és 48 órával a Dior-ballonnal elvégzett dilatációt követően sem mutattunk ki paclitaxelt.



37. ábra: A Dior-ballon-infláció hatása a paclitaxelkoncentrációra a koronária artériákban

Az eredmények $\mu\text{M/ml}$ -ben értendők, és átlag \pm S.D. -ként vannak feltüntetve

8. Diszkusszió

Eredményeink összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint a vazokonstrikció fokozódik a különböző erekben OVX után, amit E₂- vagy raloxifenkezeléssel ki lehet védeni [169, 170]. Kísérletes menopauzát követően az endogén E₂ hiánya emelkedett plazma AVP szintet, megnövekedett bazális vérnyomást és ST depressziót eredményezett, amiket hormonpótló vagy raloxifenkezeléssel normalizálni tudtunk. Ösztradiol- és raloxifenkezelés helyreállította az AVP-re adott válaszkészséget mind a szívben mind aortában, szignifikánsan csökkentve az E₂ hiányban észlelt emelkedett aortakontrakciót, illetve növelte szívperfúziót. E változás azt jelenti, hogy E₂ hiányában növekszik a hipertónia kockázata, valamint hogy az E₂ - pótló kezelés után a vérnyomás normalizálódik. A túlélő patkányorta kontrakciójának mérése azt mutatja, hogy az AVP-re adott vaszkuláris válasz egyik oka az E₂ és raloxifen direkt hatása az erek simaizomzatára.

Számos vizsgálat adatai vetették fel, hogy az érfal tónusának adrenerg regulációja változik E₂-kezelés után. Néhány kísérletben igazolták, hogy a 17- β -ösztradiol csökkenti a noradrenalinra adott presszor választ [171-174]. Zsigeri arteriolákon is bizonyították az ösztradiol vazorelaxáns aktivitását [175], a mezenterialis artériák β adrenoreceptor által mediált relaxációját pedig az E₂ szintén fokozhatja [176].

Munkacsoportunk az AVP valamint E₂ és raloxifen közötti interakciót vizsgálta. Eredményeink teljes összhangban állnak a noradrenalin esetében tapasztaltakkal [177], miszerint az endogén AVP szerepet játszhat a menopauza során tapasztalt fokozott érkontraktilitásban. Az E₂ és a raloxifen a vazodilatációnak kedvez azzal, hogy egyrészt fokozza a NOS és HO enzimek expresszióját és aktivitását, valamint más vazodilatátorok felszabadulását, emellett csökkenti a vazokonstriktorok szintézisét és szekrécióját [149]. Ezen megfigyeléseket alátámasztva azt találtuk, hogy az endogén E₂ hiánya visszaszorítja az erekben található NOS és HO enzimeket, ami következtetéseink szerint megmagyarázza az érrendszer AVP-el szembeni megnövekedett érzékenységét. Ez a hatás megfordítható E₂ vagy raloxifen adagolásával [165].

Számos kutatásnak volt célpontja az E₂ endotéliumra és vaszkuláris sejtek proliferációjára gyakorolt közvetlen hatása [178, 179]. Az E₂ és a raloxifen szignifikánsan gátolja a PDGF által stimulált proliferációt az erek simaizomsejtjeiben [180]. Ezek alapján az E₂ és a raloxifen gátló hatása feltehetően ER- okon keresztül valósul meg. Egy másik alternatíva lehet, hogy az E₂ képes befolyásolni a vazoaktív hormonok vaszkuláris hatását [149].

Ebben a tekintetben fontos megemlíteni a szexuális dimorfizmust a kardiovaszkuláris eseményekben. Különböző kutatások adatai szerint az egyes nemi hormonok specifikusak a vazopresszinre. Bryant írta le először [181], hogy az AVP által okozott vazokonstrikciónak hatással vannak a gonadális szteroidhormonok. Az iszkémiás léziók súlyosságát a vese kérgi részében a nagy dózisú vazopresszin okozta, amit az E₂-ek befolyásolnak. Hasonló eredményeket kaptak további kísérletekben is: nagy dózisú vazopresszin adagolásával kétoldali vesekéreg-nekrózist idéztek elő E₂-nel előkezelt patkányokon. Az E₂ növelte a veseartériák érzékenységét a vazopresszinre nézve [182, 183].

A legtöbb tanulmány *in vitro* preparátumokat alkalmazott. A vazopresszinre való érzékenység szignifikánsan magasabb volt az OVX nőstények és a hímek aortagyűrűjében [184]. Crofton és mtsai [150, 185] leírták, hogy a vazopresszinfúzió hatására bekövetkezett presszor válasz az ösztruszban akkor volt nagyobb, amikor a keringő ösztrogén szintje a legalacsonyabb volt.

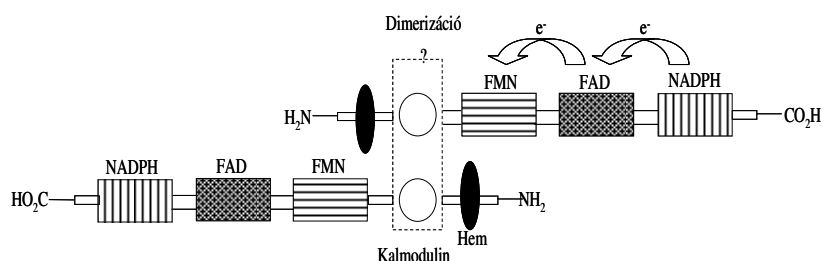
A mi jelenlegi eredményeink összhangban állnak Crofton konklúziójával. OVX patkányokban a plazma AVP szintje és az artériás vérnyomás nő, a túlélő patkányorta-ring kontrakciójának növekedése és a Langendorff szívperfúzió-csökkenés sokkal kifejezettebb, mint intakt nőstényekben. Az E₂ pótlás vagy raloxifenkezelés megszünteti az emelkedett vérnyomást és az AVP-re adott nagyobb presszor választ OVX patkányokban. Eredményeink alapján támogatjuk a korábbi megállapításokat [27-32, 165], melyek szerint a raloxifen vaszkuláris protektív hatás tekintetében E₂ agonista karakterrel bír.

Az E₂ kardioprotektív hatása részben metabolikus aktivitásainak következménye, közvetlen érfali hatásai jelentősen hozzájárulnak a szív-érrendszeri megbetegedések kockázatának csökkenéséhez [186, 187]. Az E₂ endotélfüggő, illetve az endotéltől független módon is válthat ki vazodilatációt [188-192]. Közvetlen érfali hatásainak egyik legjelentősebb mediátora a NO szintézisének és felszabadulásának potencírozása [193-196]. Az E₂ -ről igazolták, hogy a vaszkuláris simaizomzaton direkt Ca²⁺-antagonista hatást fejt ki [197, 198], ezenkívül a K⁺-csatornák nyitásával, a PgH (prostaglandin-szintáz H) -dependens vazokonstrikciónak gátlásával és a neuromuszkuláris junkción kifejtett hatása útján is vazodilatációt okoz [199-201]. Az E₂-pótló kezelés részben antiateroszklerotikus, részben direkt érfali hatásai révén a vérnyomás enyhe csökkenését eredményezi [202, 203]. Mind az akut, mind a krónikus E₂ -kezelés befolyással van az értónusra és a vaszkuláris reaktivitásra, amint azt számos klinikai vizsgálat is igazolta [204-208].

A vazodilatátor és vazokonstriktor anyagok felszabadulásának szintén fontos szerepe van az E₂ és a raloxifen által közvetített vaszkuláris védelemben.

Úgy tűnik, hogy az ösztradiol hatása a miogén tónusra endotélfüggő, egyrészt NO-szintézis által mediált válasz [209], másrészt eredményeink alapján elmondható, hogy az E₂ és a raloxifen a HO enzimek up-regulációja révén is részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer védelmi mechanizmusában. A HO enzimek expressziója és aktivitása is szignifikánsan kisebb az OVX patkányok bal szívkamrájában, mint az intakt E₂ képzéssel rendelkező kontroll nőstényekben. Míg az E₂ hiányos állapot a HO enzim szintjét lecsökkenti, a két hétig tartó E₂- vagy raloxifenkezelés a HO enzimek aktivitását és expresszióját visszaállította az intakt E₂ képzéssel rendelkező kontroll patkányokban tapasztalt szintre. Megfigyelésünk alapján a SERM raloxifen E₂ agonistaként viselkedett a HO enzimrendszer szabályozásában. Kísérleteink szívizomra vonatkozó adatai alapján a HO enzim expressziója szexuális dimorfizmust és ciklusdependenciát is mutatott. Hímekben szintén alacsonyabb aktivitást és expressziót tapasztaltunk összehasonlítva az ösztroszos nőstényekkel. Az ösztroszos és diösztroszos állatokat vizsgálva azonban meglepő eredményeket kaptunk. Bár szívben magasabb HO-1 és HO-2 expressziókat mértünk, azonban az aktivitás értékek nem különböztek. Még érdekesebb eredményeket kaptunk az aorták esetében. Itt az enzimek (HO-1 és HO-2) expressziója kisebb volt az ösztroszos állatok aortájában, viszont az aktivitás értékek itt sem különböztek. A fentiek oka valószínűleg több oka lehet. Az egyik, az eltérő szöveti összetétel lehet, a másik pedig, hogy ösztrosz és diösztrosz között nem olyan jelentős az ösztrogén szint különbség, mint a menopauza és az ösztroszos állatok hormonja szintje között van.

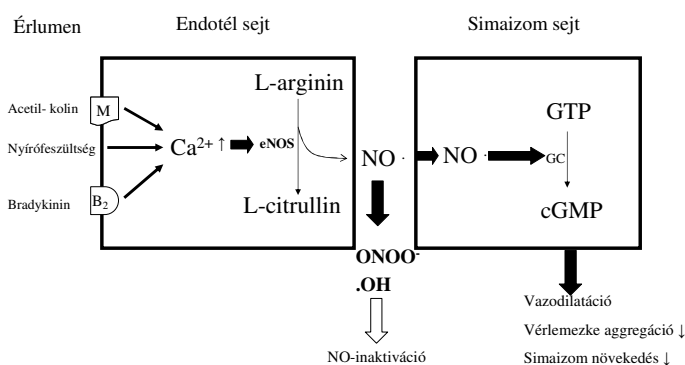
Kutatócsoportunk korábbi kísérletei az E₂ és raloxifen NOS rendszerre kifejtett hatásaira irányultak. A cNOS reverzibilis módon, Ca²⁺ jelenlétében kötődik a kalmodulinhoz (38. ábra), és két szövetspecifikus izoformája létezik: eNOS, amelyet az ér endotheliumsejtjeiben fedeztek fel, és a nNOS, amit idegi elemekben írtak le [127, 210]. Kimutatták, hogy mindkét izoformának egymástól független, önálló hatása van a kardiális funkciókra [211], továbbá hogy az E₂ szelektíven fokozza mindkét izoenzim aktivitását [212, 213].



38. ábra A NOS egy hipotetikus modellje, és a működése alatt feltételezett elektrontranszport.

A domain tartalmaz NADPH, FMN, FAD és valószínűleg citokróm P-450 reduktázt (hem-kötőhely) is. A szabályozó domain magába foglalja a Kalmodulin kötőhelyet is.

Ezen megállapítások alapján kutatócsoportunk arra a következtetésre jutott, hogy az OVX patkányok szívében az NO-szint E_2 - vagy raloxifenkezelést követő Ca^{2+} -függő cNOS-aktivitás fokozódásának hatására jelentkező növekedésében az eNOS és nNOS izoenzimek együttesen játszanak szerepet. Az eNOS és a nNOS által szintetizált NO fontos szerepet játszik a vaszkuláris integritás fenntartásában [127, 210, 212, 214, 215]. Az eNOS által kifejtett kardiovaszkuláris védőhatás igen jellemző. Egyrészt az általa előállított NO az ér simaizomsejtjeinek elernyedését okozza, másrészt gátolja a trombocytaktivációt, valamint a trombocyt- és leukocytadhéziót, valamint -aggregációt a vaszkuláris endotélhez [127, 210] (39. ábra).



39. ábra Az endotéliumfüggő relaxáció folyamatábrája. Az endothelinmembránon levő receptor hatására növekszik a Ca^{2+} -beáramlás.

A megnövelt Ca^{2+} -szint a Kalmodulinnal együtt aktiválja a NOS-t. A keletkezett NO átdiffundál a simaizomsejtekbe, és aktiválja a GC-át, s ennek eredményeképpen megnő a cGMP-szint, ami relaxációt vált ki. Az L-NNA és az L-NAME gátolja a NOS működését.

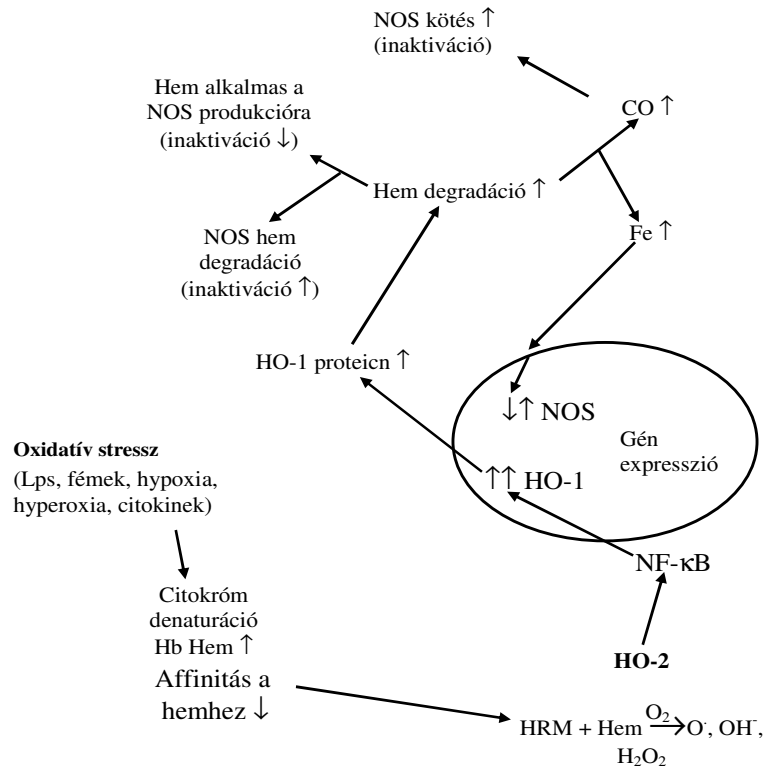
Számos megfigyelés utal arra, hogy a cNOS enzimek működését a nemi hormonok befolyásolják [124]. Kimutatták, hogy az érfalak tónusa csökken a terhesség során, amikor a plazma E_2 szintje magas [216]. A külsőleg adagolt E_2 -ről tudjuk, hogy növeli az erek endotéliumfüggő relaxációját [217]. Nőstény nyulakból, egerekből vagy patkányokból izolált aortagyűrűkből nagyobb mennyiségű NO szabadul fel, mint az OVX nőstény vagy hím társaikéból [218-220]. Sejtenyészeteket vizsgálva azt találták, hogy az E_2 adagolása receptorközvetített módon fokozza az eNOS aktivitását [221]. A 17- β -ösztradiol fiziológiás koncentrációban alkalmazva olyan szintre emeli az endotélsejtek bazális NO termelését, amely az előzetesen kontrahált koronáriaerek átmérőjének növelésére képes patkányban [222]. Humán vizsgálatokban azt is kimutatták, hogy a cNOS enzimek működésének gátlása nagyobb vazokonstriktiót okoz szabályos menstruációs ciklusú nőkben, mint azonos korú férfiakban [223]. Menopauza után lévő nőkben pedig az ösztradiolkezelés javította a vazodilatációt, feltehetően a magasabb NO-szint kialakítása révén [224]. Végül, krónikus E_2 - és raloxifenkezelés hatására fokozódott az NO

felszabadulása patkány aortagyűrű endotéliumából, és nőtt a cNOS mRNS expressziója [126, 225].

Ezen ismeretek alapján nagy valószínűséggel megállapítható, hogy vizsgálatunkban az intakt endogén E₂ képzéssel rendelkező kontroll nőtény, valamint a 17- β -ösztradiol- vagy raloxifenkezelt OVX patkányokban a szívizom iszkémiára való hajlamának csökkentésében mindkét, az E₂ közvetített módon up-regulált enzim, a NOS és HO egyaránt szerepet játszik. A nem szelektív NOS-gátló L-NAME kezelést követően, valamint HO-inhibitor (SnPP) kezelést alkalmazva a szívizom-iszkémia szignifikánsan súlyosbodott az E₂ patkányokban, valamint megjelent az intakt nőtényekben, illetve a 17- β -ösztradiol- vagy raloxifenkezelt ovariektomizált patkányokban, amely eredmények alátámasztják az E₂ által közvetített NOS, valamint HO enzim szabályozás szerepét a kardiovaszkuláris védelemben. Megfigyeléseink a raloxifen E₂ agonista hatását igazolták, továbbá, hogy az NO-szabályozás mellett egyéb, NO-tól független mechanizmusok is szerepet játszanak az E₂-közvetítette kardiális védelemben. Ilyen folyamatok például az oxidatív stressz elleni védelem [226, 227], érsimaizomsejt-proliferáció gátlása [180], Ca²⁺-függő K⁺ csatornák nyitása [228], és a renin-angiotenzin rendszer befolyásolása [229].

Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a NOS mellett a HO enzimek és reakciótermékeik is szerepet játszanak a keringési rendszer védelmi mechanizmusában. A HO enzimek expressziójának nemek közötti különbségeivel, és ezen rendszeren belül az E₂ szabályozó szerepével azonban nagyon kevesen foglalkoztak. A témával kapcsolatban eddig mindössze két tanulmány jelent meg: Veltman és mtsai nőtény patkányok mellékveséjében kétszer akkora HO-aktivitást mért, mint a hímekében [230]; Tschugguel és munkacsoportja pedig humán mintákon *in vitro* végzett kísérleteiben nemrég mutatta ki, hogy az E₂ receptorközvetített úton serkenti a HO-2 expresszióját, valamint fokozza a CO felszabadulását az endotéliumból és a CO-indukálta cGMP képződést [231].

A 40. ábra a HO és a NOS rendszer egyik feltételezett kapcsolatát szemlélteti.



40. ábra: A HO és a NOS rendszer egymásrahatása

Kísérleteink során alapvető célunk volt, hogy kimutassuk az E₂ és a raloxifen HO-aktivitást szabályozó szerepét a kardiovaszkuláris rendszerben.

Eddigi eredményeinken és az irodalomban leírtakon alapuló hipotézisünk, hogy az E₂ növeli a HO és cNOS expresszióját, valamint aktivitását a kardiovaszkuláris szövetekben, és ez a fokozott enzimműködés kulcsfontosságú szerepet játszik az E₂ keringési rendszerben kifejtett védő hatásában, ahol a raloxifen E₂ agonistaként viselkedik.

Adataink alapján feltételezzük, hogy E₂- valamint raloxifenpótlás hatására nő mind az NO-szint, mind a HO reakciótermékeinek mennyisége, és ezek a mediátorok erősítik egymás kedvező hatását. Tehát a szív iszkémiával szembeni védelmét ez a két fő mechanizmus képviseli. További kísérleteinkben igazoltuk hogy egy klinikumban is alkalmazott antiproliferatív hatású vegyület a paclitaxel rövid idő alatt képes olyan koncentrációban beépülni a koronáriákba, hogy kifejtse antiproliferatív hatását [232] Irodalmi adarak szerint a paclitaxel hatékonyan indukálja a HO-1 gén expresszióját VSMC-ekben. Choi és munkatársai azt tapasztalták, hogy VSMC-ekben paclitaxelkezelés hatására megemelkedik mind a HO-1 mRNS, mind a HO-1 fehérje mennyisége, ami az enzimaktivitás megfelelő növekedésével jár együtt. A stressz hatására bekövetkező HO-1 indukcióra irányuló kutatások kimutatták, hogy a génexpresszió

iniciációjához szükséges szignálok transzdukciója MAPK-kat magukba foglaló útvonalakon történik [233-235]. Chen és Maines [235] kimutatták, hogy HeLa sejtekben NO hatására ERK és p38 útvonalakon keresztül emelkedik meg a HO-1 mRNS mennyisége, de a SAPK/JNK útvonal nem érintett a folyamatban. Egy másik humán sejtvonalban, a HepG2-ben a MEKK1 túltermelése a HO-1 fehérje expressziójának indukcióját eredményezte [236]. A HO-1 útvonal simaizomsejtekre kifejtett antiproliferatív hatását *in vitro* patkány VSMC-kben írták le [142], majd *in vivo* állatmodellekben igazolták [143]. A HO-1 által katalizált CO-felszabadulás szintén fontos adaptív mechanizmust biztosíthat a homeosztázis fenntartásában a vaszkuláris sérülés helyén. A paclitaxelről szintén leírták, hogy nanomólos mennyiségben is gátolja a VSMC -proliferációt és -migrációt *in vitro*, valamint hogy megelőzi a neointimális VSMC -akkumulációt az arteria carotisban *in vivo* [140]. A HO-1 feltehetőleg közrejátszik a paclitaxel VSMC-proliferációra gyakorolt szuppresszív hatásában. Ezen hatások a HO-gátló ZnPP IX jelenlétében nem mutatkoztak, ami arra enged következtetni, hogy a paclitaxel által indukált HO mediálja a vegyület PDGF-függő VSMC-proliferációra kifejtett gátlóhatását. Továbbá korábbi vizsgálatok során bizonyították, hogy a VSMC-proliferációt a CO gátolja [142, 144].

A jelen tanulmányban az artériafal paclitaxelkoncentrációját sertés koronária artériájának egyes, illetve bifurkációs szegmenseiben 1,5, 12, 24 és 48 órával a dilatációt követően meghatározva megerősítettük a paclitaxel Dior-ballonnal történő bejuttatásának hatékonyságát. Kimutattuk a paclitaxel dilatáció helyével érintkező artériaszegmensekbe történő diffúzióját, de a vegyület koncentrációja itt jóval alacsonyabbnak bizonyult, mint a dilatált szegmensben. A két Dior-ballonnal kivitelezett bifurkációs intervenció mintegy 2-3-szoros szöveti paclitaxelkoncentrációt eredményezett mind a fő-, mind a mellékágakban, ami a hatóanyag elegendő mennyiségben történő jelenlétét mutatja a bifurkációs léziók legérzékenyebb pontjain. A mért szöveti paclitaxelkoncentráció a sejtkultúrákkal kapcsolatban közöltekkal azonos effektív tartományba esett, és a koronária artéria simaizom- és endoteliális sejteinek migrációjára és proliferációjára kifejtett gátlóhatás is azonos volt (effektív dózis: 56 nM - 50 µM, toxikus hatás 100 µM felett) [140]. Eredményeink összhangban állnak Speck és Scheller kutatócsoportjainak megfigyeléseivel atéren, hogy 15 perccel, illetve 2 órával 100-200 µg, kontraszt anyagban feloldott paclitaxellel történő kezelés után a LAD-ban és az LCx-ben 2,89-5,28 µM és 2,0 µM/L szöveti paclitaxelkoncentrációt mértek, ami időben fokozatosan csökkent, de hatékonyan gátolta a neointimális növekedést 28 nappal a stent beültetése után is [131, 237]. Kísérleteinkben a paclitaxelkoncentráció jelentős csökkenését figyeltük meg az egyes és dupla ballonnal történő kezelés utáni első 12 órában is. Axel és munkatársai kimutatták, hogy a paclitaxel hosszútávú

hatással bír mindössze néhány perces kezelés után is, ami a resztenózis lokális antiproliferatív kezelésének ígéretes jelöltjévé teszi e lipofil vegyületet [140]. A ballon előnye, hogy bifurkációs léziók esetében is alkalmazható. Vizsgálatainkban 2-3-szor magasabb szöveti paclitaxelkoncentrációt figyeltünk meg, mint egyszeres ballondilatáció után, és az érték 12 óra múltán csökkent az egyszeres dilatáció esetében tapasztalt szintre. Érdekes módon a dilatált résztől proximálisan és disztálisan elhelyezkedő szegmensekben is kimutattuk a paclitaxel jelenlétét mind egyes szegmensek, mind bifurkációk esetében. Ez a vegyület artériában történő longitudinális diffúziójára utal, ami jótékony hatást fejthet ki a széli resztenózis mérséklésében. Más kutatócsoportok megfigyeléseivel ellentétben mi kísérleteink során a plazmában nem mutattunk ki paclitaxelt, ami a módszer biztonságosságát támasztja alá.

Összegezve, a koronária artériába a vegyülettel bevont ballonnal történő rövid idejű, lokális paclitaxelbejuttatás a hatóanyag megfelelő szöveti koncentrációját képes biztosítani, ami alkalmas a koronária artériák neointimális növekedésének hatékony gátlására. A paclitaxel feltételezhetően a HO rendszeren keresztül fejti ki antiproliferatív hatását ezért távlati céljaink között szerepel ezen enzimrendszerrel való *in vivo* kapcsolat igazolása, továbbá az E₂ közvetítette hatás vizsgálata házi sertés állatmodelben

9. Következtetések

A Célkitűzések fejezetben feltett kérdésekre vizsgálataink alapján az alábbi válaszokat kaptuk:

1. E₂ hiány kardiovaszkuláris hatásai

1.1. Hím patkányokban és ösztrogén hiányos nőstény állatokban a vérplazma AVP szintje emelkedett, a bazális vérnyomás és a szívizom iszkémiára való hajlama, valamint az AVP-re adott aorta abdominalis kontrakció fokozódott, továbbá az AVP-re csökkent szívperfúziós választ tapasztaltunk a megtartott ováriumú ösztrosz fázisú nőstény csoporthoz viszonyítva.

1.2. Az OVX nőstényeken alkalmazott E₂- vagy raloxifen-monoterápia után ezek a paraméterek normalizálódtak.

3. A HO enzimek expressziója és aktivitása csökkent a hím, valamint OVX nőstények bal szívkamrájában és aortájában. Az enzimblokkoló alkalmazásával súlyosbodott ST depresszióból, AVP-re adott vérnyomásból és szívperfúzióból arra következtethetünk, hogy a HO is lényeges szerepet játszik az E₂-közvetítette védőmechanizmusokban.

Nőstény patkányok különböző E₂-telítettségi állapotát vizsgálva aktivitás tekintetében nem találtunk különbséget sem aortában sem szívizomban. A HO-expresszió vonatkozásában az ösztroszos állatok szívizom szövetében magasabb HO-1 és HO-2 volt mérhető azonban az aortában pont ellenkező irányú változás volt megfigyelhető, ami a szövettani különbözőségegre vezethető vissza.

2. Kardiovaszkuláris betegségek helyi gyógyszeres kezelése

2.1. Sertés modellben a koronária artériák rövid idejű, hatóanyaggal bevont ballonnal történő lokális paclitaxelkezelése elegendő a vegyület megfelelő szöveti koncentrációjának biztosításához, ami hatékonyan serkengeti a koronáris artériák HO enzimrendszer által mediált antiproliferatív hatását.

10. Összefoglaló

Háttér: A hipertenzív- és koronária érbetegség előfordulásában, az ateroszklerózis kialakulásában mutatkozó nemek közti különbségek az ösztrogén (E_2) miokardiumra, vaszkuláris simaizomra és endotéliumra kifejtett közvetlen hatásának tulajdoníthatók. Mivel a hormonpótlás kardiovaszkuláris események kockázatára gyakorolt hatásai vitatottak, és a nagy dózisú E_2 -nel történő kezelés emlő- és endometriális rák kialakulásához vezethet, a szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok (SERM) a figyelem középpontjába kerültek. A raloxifen egy második generációs SERM a kardiovaszkuláris rendszerben E_2 agonistaként, míg az emlőkben és az endometriumban antagonistaként viselkedik. A nitrogén-monoxid (NO) valamint a HO (hem-oxigenáz) enzimrendszer által termelt CO részt vesz az E_2 -közvetítette kardiovaszkuláris védelemben. A paclitaxel számos tulajdonsága teszi a ballon-angioplasztikát vagy stentbeültetést követő resztenózisban előforduló kiterjedt arteriális simaizomsejt-proliferáció elleni lokális hatóanyagterápia ígéretes jelöltjévé. Annak lehetőségét szintén vizsgálják, hogy ezen antiproliferatív hatásokban a HO indukciója is szerepel-e.

Célok: 1. Munkánk során az E_2 és a raloxifen HO-1 és HO-2 enzimek által modulált hatásait kívántuk tisztázni patkány kardiovaszkuláris rendszerében. 2. A HO rendszert számos anyag befolyásolja, és az egyik ilyen vegyület a paclitaxel, ami a HO-indukción keresztül antiproliferatív hatással bír. Ezért célunk a dilatált artériafal és a környező szegmensek szöveti paclitaxelkoncentrációját 1,5, 12, 24 és 48 órával a dilatáció után meghatározva a hatóanyagelűlő ballonnal véghezvitt, egyes koronária artériaszegmenseket illetve bifurkációkat érintő kezelést követően a koronária artéria falába történő paclitaxel-felvétel bebizonyítása volt.

Módszerek: Az E_2 HO enzimrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálatára intakt ösztrosz és diösztrosz fázisú, ovariectomizált (OVX), raloxifennel, illetve 17- β -ösztradiollal kezelt OVX nőtény, valamint hím Wistar patkányokat használtunk. Meghatároztuk a plazma AVP (arginin-vazopresszin) szintjét, a bazális vérnyomást, az ST depresszió mértékét, a HO-aktivitást, valamint a HO-1 és HO-2 expresszióját szívkamra- és aortaszövetekben, az AVP-re adott vérnyomásemelkedést, az aortakontrakciót, és a szívperfúziót.

Nyolc házi sertésen végeztük el a középső bal anterior leszálló, bal circumflex és proximális jobb koronáris artériák 2x30 másodperces, Dior-ballonnal történő dilatációját és meghatároztuk a szöveti paclitaxelkoncentrációt. A szövetekből 1,5, 12, 24 és 48 órával a dilatációt követően, míg a plazmából különböző időpontokban vettünk mintát.

Eredmények: E_2 hiányában csökkent a HO-aktivitás, valamint a HO-1 és HO-2 expressziója, emelkedett a szívizom elváltozás előfordulási gyakorisága és az AVP-indukálta vérnyomásválasz és

aortakontrakció, míg a szívperfúzió csökkent az intakt nőstényekkel összehasonlítva. A 17- β -ösztradiol-, illetve raloxifenpótlás intakt nőstényekben tapasztalt szintre állította vissza az OVX által indukált eltéréseket. Az SnPP (HO inhibitor)-kezelés hatására intenzívebbé vált az AVP-indukálta vérnyomásválasz és szívperfúzió.

Az egyes dilatált szegmensben mért szöveti paclitaxelkoncentráció szignifikáns csökkenést mutatott 12, 24 és 48 óra után.

Diszkusszió: Az E₂ és a raloxifen a HO-szintézis serkentésén keresztül is részt vesz a kardiovaszkuláris rendszer védelmében. Az általunk vizsgált rendszerben a raloxifen E₂-agonistaként viselkedett. A koronária artéria rövid idejű, paclitaxellel bevont ballonnal történő kezelése elegendő a vegyület megfelelő szöveti koncentrációjának biztosításához, ami hatékonyan gátolja neointimális növekedését.

Távlati célok: Annak igazolása, hogy a paclitaxel a HO enzimrendszerre kifejtett indukció által fejt ki antiploriferatív hatását továbbá az E₂ közvetítette mechanizmus szerepének vizsgálata házi sertés modellben.

11. Summary

Background. Gender-based differences in the incidence of hypertensive and coronary artery disease, the development of atherosclerosis are attributable to the direct effect of estrogen on the myocardium, vascular smooth muscle and endothelium. Since the effects of hormone replacement therapy on the risk of cardiovascular events are controversial, and treatment with estrogen in high dose can cause breast and endometrial carcinoma, selective estrogen receptor modulators (SERMs) have come to the focus of attention. Raloxifene, a second generation selective estrogen receptor modulator (SERM), acts as an estrogen agonist in cardiovascular system but as an estrogen antagonist in breast and endometrium. Nitric oxide (NO), as well as CO produced by the HO (heme-oxygenase) enzyme system are involved in estrogen mediated vasoprotection. Paclitaxel has several properties that make it a promising candidate for local drug therapy of excessive arterial smooth muscle cell proliferation in restenosis after balloon angioplasty or stent implantation. The possibility of the anti-proliferative effects of paclitaxel may include the induction of HO-1 has also been examined.

Aims: The aim of our work was to clarify the effects of the estrogen and raloxifene modulated by HO-1 and HO-2 enzymes in rat cardiovascular system. HO system is influenced by several materials, including paclitaxel, which possess antiproliferative effects via HO induction. Therefore the aim of our study was to confirm the uptake of paclitaxel in the coronary arterial wall after usage of a paclitaxel-eluting balloon in the porcine single coronary arterial segments and bifurcations, by measurement of the tissue paclitaxel concentrations in the dilated arterial wall and the adjacent segments at 1.5, 12, 24 and 48 hours post-dilation.

Methods: In order to study the effect of estrogen on HO enzyme system we examined intact female Wistar rats in estrus phase, as well as ovariectomized (OVX), raloxifene or 17- β -estradiol treated OVX female and male animals. We determined the plasma arginine-vasopressin (AVP) level, the basal blood pressure, the activity of HO and expression of HO-1 and HO-2 in the ventricle and aortic tissues, the ST depression, the increase in blood pressure and heart perfusion induced by AVP.

Eight domestic pigs were subjected to 2x30 sec Dior balloon dilatation of the mid left anterior descending, left circumflex and proximal right coronary arteries and tissue paclitaxel concentrations were measured. Tissue samples were harvested at mean 1.5, 12, 24 and 48 h after balloon dilatation and plasma samples were taken at various time points[237].

Results: The lack of estrogen decreased HO activity, as well as HO-1 and HO-2 expression, the tendency of heart ischemia, the response of blood pressure and aorta contraction as response to AVP was elevated, while, heart perfusion was lowered as compared to intact females. 17- β -estradiol and raloxifene replacement restored the differences induced by OVX to the level observed in the ovary-intact females. SnPP (inhibitor of HO) treatment intensified the response of blood pressure and heart perfusion to AVP. The tissue paclitaxel concentration of the single dilated segment decreased significantly at 1.5, 12, 24 and 48 h post-dilatation.

Discussion: E₂ and raloxifene were found to be involved in the protection of cardiovascular system via the augmentation of HO synthesis. In the system applied, raloxifene had estrogen agonistic effect. Short exposure of the coronary artery to paclitaxel with a coated balloon is sufficient for the attainment of an adequate tissue concentration of paclitaxel, which efficiently inhibits neointimal growth.

Further plans: We are intending to prove that the anti-proliferative effect of paclitaxel is achieved via the induction of HO enzyme system, as well as to examine the role of E₂-mediated mechanism in domestic pig model.

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Gyöngyösi Mariann egyetemi docensnek, Dr. Varga Csaba egyetemi docensnek, Ifj. Dr. László Ferenc egyetemi tanárnak témavezetői munkájukért, építő kritikáikért, hasznos tanácsaikért,

Dr. László Ferenc professzor úrnak a hasznos tanácsaiért

Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, Dr. Fekete Éva egyetemi tanárnak amiért megszeretették velem a neurobiológiát és az élettant,

Berkó Anikónak akinek technikai rátermettsége és együttérző szavai nélkülözhetetlenek voltak a munkám elvégzéséhez,

Horváth Krisztinának, Molnár Andornak, Molnár Zitának, Szabó Györgyinek segítőkészségükért és türelmükért,

Veketyné Váradi Margónak a rengeteg adminisztrációs segítségéért.

Mérnök Úrnak a technikai segítsége nélkül soha nem „nyúlt volna az az aorta” ☺.

Doktori disszertációm elkészítéséhez nyújtott további segítségükért köszönetemet fejezem ki az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi fel nem sorolt munkatársának is.

Szeretném megköszönni barátaimnak Bereczki Zsoltnak, Dobos Nikolettának, Gyenes Andreának, Hatvani Lórántnak, Kis Gyöngyinek az egyetemi éveket, a rengeteg hasznos szakmai tanácsot és közös munkát. Továbbá hálás vagyok amiért mellettem voltak a válságosnak tűnő pillanatokban is.

Nagyon hálás vagyok Gyurinak, a szüleimnek, nagyapámnak akik mindenben támogattak és segítettek, hogy eljuthassak ennek a munkának a befejezéséig és akik a legtöbbet tették értem.

A kísérletek elvégzéséhez a következő szervezetek biztosítottak anyagi és technikai támogatást:

William Harvey Research Institute, London

Eli Lilly Pharmaceutical Company

Bolyai János Kutatási Ösztöndíj

Egészségügyi Minisztérium (ETT)

Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA)

Gazdasági Versenyképesség Operatív Program (GVOP-3.2.1-2004-04-0086/3.0)

Öveges J. pályázat

Lilly Centre for Women Health Research Grant

Stiftung Aktion Österreich-Ungarn (OMA 59üu14)

Verein zur Förderung der Forschung – ATVB

Verein zur Förderung der Forschung im Bereich der experimentellen und klinischen Kardiologie
and B&P Research Gmbr.

13. Irodalomjegyzék

1. Mosca, L., et al., *Design and methods of the Raloxifene Use for The Heart (RUTH) study*. Am J Cardiol, 2001. **88**(4): p. 392-5.
2. Acs, N., et al., *Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular mortality in Central-Eastern Europe*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2000. **55**(3): p. M160-2.
3. Colditz, G.A., et al., *Menopause and the risk of coronary heart disease in women*. N Engl J Med, 1987. **316**(18): p. 1105-10.
4. Taddei S, V.A., Chiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, Pinto S, Salvetti A, *Menopausa is associated with endothelial dysfunction in women*. Hypertension, 1996. **28**(576-582).
5. Bush, T.L., et al., *Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study*. Circulation, 1987. **75**(6): p. 1102-9.
6. Stampfer, M.J., et al., *Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study*. N Engl J Med, 1991. **325**(11): p. 756-62.
7. Stampfer, M.J. and G.A. Colditz, *Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence*. Prev Med, 1991. **20**(1): p. 47-63.
8. Lobo, R.A., *The role of progestins in hormone replacement therapy*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **166**(6 Pt 2): p. 1997-2004.
9. Adams, M.R., et al., *Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(1): p. 217-21.
10. Crews, J.K. and R.A. Khalil, *Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 1034-40.
11. Gilon, D., et al., *Insights from three-dimensional echocardiographic laser stereolithography. Effect of leaflet funnel geometry on the coefficient of orifice contraction, pressure loss, and the Gorlin formula in mitral stenosis*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 452-9.

12. Levine, R.L., et al., *Medroxyprogesterone attenuates estrogen-mediated inhibition of neointima formation after balloon injury of the rat carotid artery*. *Circulation*, 1996. **94**(9): p. 2221-7.
13. Register, T.C., et al., *Conjugated equine estrogens alone, but not in combination with medroxyprogesterone acetate, inhibit aortic connective tissue remodeling after plasma lipid lowering in female monkeys*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(7): p. 1164-71.
14. Sorensen, K.E., et al., *Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function*. *Circulation*, 1998. **97**(13): p. 1234-8.
15. Wen, Y., et al., *Combined oestrogen-progestogen replacement therapy does not inhibit low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women*. *Br J Clin Pharmacol*, 1999. **47**(3): p. 315-21.
16. Grodstein, F., et al., *Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(7): p. 453-61.
17. Furberg CD, V.E., Davidson M, Herrington DM, Simon JA, Wenger NK, Hulley S, *Subgroup interactions in the heart and estrogen/progestin replacement study*. *Circulation*, 2002. **105**(917-922).
18. Manson, H., Johnson, Rossouw, Assaf, Lasser, Trevisan, Black, Heckbert, Detrano, Strickland, Won, Crouse, Stein, Cushman, *Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 2003. **10**(301-11).
19. Investigators, W.G.o.t.W.s.H.I., *Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal result from the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. *JAMA*, 2002. **288**.
20. Tang, M.X., et al., *Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease*. *Lancet*, 1996. **348**(9025): p. 429-32.
21. Andersson, M., H.H. Storm, and H.T. Mouridsen, *Carcinogenic effects of adjuvant tamoxifen treatment and radiotherapy for early breast cancer*. *Acta Oncol*, 1992. **31**(2): p. 259-63.
22. Anker, G., et al., *Plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine in postmenopausal women with breast cancer treated with tamoxifen*. *Int J Cancer*, 1995. **60**(3): p. 365-8.

23. Sato, M., M.K. Rippey, and H.U. Bryant, *Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats*. *Faseb J*, 1996. **10**(8): p. 905-12.
24. Lerner, L.J., F.J. Holthaus, Jr., and C.R. Thompson, *A non-steroidal estrogen antiagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol*. *Endocrinology*, 1958. **63**(3): p. 295-318.
25. Guetta, V., et al., *Effects of the antiestrogen tamoxifen on low-density lipoprotein concentrations and oxidation in postmenopausal women*. *Am J Cardiol*, 1995. **76**(14): p. 1072-3.
26. Mitlak, B.H. and F.J. Cohen, *Selective estrogen receptor modulators: a look ahead*. *Drugs*, 1999. **57**(5): p. 653-63.
27. Black, L.J., et al., *Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(1): p. 63-9.
28. Turner, C.H., M. Sato, and H.U. Bryant, *Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats*. *Endocrinology*, 1994. **135**(5): p. 2001-5.
29. Anzano, M.A., et al., *Chemoprevention of mammary carcinogenesis in the rat: combined use of raloxifene and 9-cis-retinoic acid*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(2): p. 123-5.
30. Delmas, P.D., et al., *Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(23): p. 1641-7.
31. Blum, A. and R.O. Cannon, 3rd, *Effects of oestrogens and selective oestrogen receptor modulators on serum lipoproteins and vascular function*. *Curr Opin Lipidol*, 1998. **9**(6): p. 575-86.
32. Grese, T.A. and J.A. Dodge, *Selective estrogen receptor modulators (SERMs)*. *Curr Pharm Des*, 1998. **4**(1): p. 71-92.
33. Broulik, P.D., *Tamoxifen prevents bone loss in castrated male mice*. *Horm Metab Res*, 2000. **32**(5): p. 181-4.
34. Fitts, J.M., R.M. Klein, and C.A. Powers, *Comparison of tamoxifen and testosterone propionate in male rats: differential prevention of orchidectomy effects on sex organs, bone mass, growth, and the growth hormone-IGF-I axis*. *J Androl*, 2004. **25**(4): p. 523-34.

35. Ke, H.Z., et al., *Lasofoxifene (CP-336,156) protects against the age-related changes in bone mass, bone strength, and total serum cholesterol in intact aged male rats.* J Bone Miner Res, 2001. **16**(4): p. 765-73.
36. Ke, H.Z., et al., *Lasofoxifene (CP-336,156), a selective estrogen receptor modulator, prevents bone loss induced by aging and orchidectomy in the adult rat.* Endocrinology, 2000. **141**(4): p. 1338-44.
37. Folwarczna, J., et al., *Raloxifene similarly affects the skeletal system of male and ovariectomized female rats.* Pharmacol Rep, 2007. **59**(3): p. 349-58.
38. Boss, S.M., et al., *Effects of raloxifene hydrochloride on the endometrium of postmenopausal women.* Am J Obstet Gynecol, 1997. **177**(6): p. 1458-64.
39. Cummings, S.R., et al., *The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation.* Jama, 1999. **281**(23): p. 2189-97.
40. Gruber CJ, T.W., Schneeberger C, Huber JC, *Production and actions of estrogens.* N Engl J Med, 2002. **346**(340-52).
41. McDonnell, *The molecular pharmacology of SERMs.* Trends Endocrinol Metab., 1999. **10**(321-44).
42. Jordan, *Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective.* Cancer Res, 2001. **61**(5683-7).
43. Kuiper, *Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary.* Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(5925-5930).
44. Couse JF, K.K., *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr. Rev., 1999. **20**(358-417).
45. Lindberg MK, M.S., Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C, *Estrogen receptor beta reduces estrogen receptor alpha regulated gene transcription, supporting a "ying-yang" relationship between estrogen receptor alpha and beta in mice.* N Engl J Med, 2003. **349**(523-534).
46. Hall JM, M.D., *The estrogen receptor beta-isoform of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens.* Endocrinology, 1999. **140**(5566-78).
47. Pettersson, D., Gustafsson, *Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling.* Oncology, 2000. **19**(4970-8).

48. Brozowski AM, P.A., Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T., Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M, *Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(753-758).
49. Shiau, B., Loria, Cheng, Kushner, Agard, Greene, *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of the interaction by tamoxifen*. Cell., 1998. **95**(927-37).
50. Paige, c., Gron, Norris, Gottlin, Padilla, Chang, Ballas, Hamilton, McDonnell, *Estrogen receptor modulators each induce distinct conformational changes in estrogen receptor alpha and beta*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. **96**(3999-4004).
51. Smith, N., O'Malley, *Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxitamoxifen*. Mol. Endocrinol., 1997. **11**(657-66).
52. McKenna, L., O'Malley BW, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr. Rev., 1999. **20**(321-44).
53. Norris, P., Christensen, Chang, Chang, Huacani, Fan D, Hamilton PT, Fowlkes DM, McDonnell DP, *Peptide antagonists of the human estrogen receptor*. Science, 1999. **285**(744-6).
54. Jepsen K, H.O., Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEvelly RJ, Kurokawa R, Kumar V, Liu F, Seto E, Hedrick SM, Mandel G, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG, *Combinatorial roles of nuclear receptor corepressor in transcription and development*. Cell., 2000. **102**(753-63).
55. Shang Y, B.M., *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. Science, 2002. **295**(2465-8).
56. Brzowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
57. Tzukerman, M.T., et al., *Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(1): p. 21-30.
58. MacGregor, J.I. and V.C. Jordan, *Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(2): p. 151-96.
59. Bryant, H.U. and W.H. Dere, *Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy*. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **217**(1): p. 45-52.
60. Hall, J.M., J.F. Couse, and K.S. Korach, *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 36869-72.

61. Collins, P. and C. Webb, *Estrogen hits the surface*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1130-1.
62. Moggs, J.G. and G. Orphanides, *Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses*. EMBO Rep, 2001. **2**(9): p. 775-81.
63. Ho, K.J. and J.K. Liao, *Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease*. Mol Interv, 2002. **2**(4): p. 219-28.
64. Nabulsi, A.A., et al., *Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators*. N Engl J Med, 1993. **328**(15): p. 1069-75.
65. Wilcox, J.G., et al., *Cardioprotective effects of individual conjugated equine estrogens through their possible modulation of insulin resistance and oxidation of low-density lipoprotein*. Fertil Steril, 1997. **67**(1): p. 57-62.
66. Akishita, M., et al., *Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta*. Atherosclerosis, 1996. **125**(1): p. 27-38.
67. Chen, S.J., et al., *Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery*. Circulation, 1996. **93**(3): p. 577-84.
68. Clemente, C., et al., *Antioxidant effect of short-term hormonal treatment in postmenopausal women*. Maturitas, 1999. **31**(2): p. 137-42.
69. Nakano, Y., et al., *Effect of 17beta-estradiol on inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(6): p. 961-7.
70. Shwaery, G.T., J.A. Vita, and J.F. Keaney, Jr., *Antioxidant protection of LDL by physiologic concentrations of estrogens is specific for 17-beta-estradiol*. Atherosclerosis, 1998. **138**(2): p. 255-62.
71. Walsh, B.A., et al., *17 beta-estradiol reduces glycoxidative damage in the artery wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 840-6.
72. Akishita, M., et al., *Effects of estrogen on atherosclerosis formation and serum nitrite/nitrate concentrations in cholesterol-fed ovariectomized rabbits*. J Atheroscler Thromb, 1996. **3**(2): p. 114-9.
73. Dubuisson, J.T., et al., *Association of hormone replacement therapy and carotid wall thickness in women with and without diabetes*. Diabetes Care, 1998. **21**(11): p. 1790-6.
74. Haarbo, J. and C. Christiansen, *The impact of female sex hormones on secondary prevention of atherosclerosis in ovariectomized cholesterol-fed rabbits*. Atherosclerosis, 1996. **123**(1-2): p. 139-44.

75. Hulley, S., et al., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group.* *Jama*, 1998. **280**(7): p. 605-13.
76. Krasinski, K., et al., *Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury.* *Circulation*, 1997. **95**(7): p. 1768-72.
77. Nagai, Y., et al., *Influence of age and postmenopausal estrogen replacement therapy on carotid arterial stiffness in women.* *Cardiovasc Res*, 1999. **41**(1): p. 307-11.
78. Bongard, V., et al., *Transdermal estrogen replacement therapy and plasma lipids in 693 French women.* *Maturitas*, 1998. **30**(3): p. 265-72.
79. Brown SA, H.R., Morrisett J, Boerwinkle E, Davis CE, Gotto AM Jr, Patsch W., *Plasma lipid, lipoprotein cholesterol and apolipoprotein distributions in selected US communities. ARIC Study.* *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997. **1993**(13): p. 1139-58.
80. Cox D. A., S.A., Paul S, *Effects of raloxifene and hormone replacement therapy on markers of inflammation in healthy postmenopausal.* *Osteoporos*, 2000. **2**(207).
81. Walsh, P., Wild, Dean, Tracy, Cox, Anderson, *The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal woman: randomized, controlled trial.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(214-18).
82. Adams M. R, K.J.R., Manick S.B., Kortnik D.R., Parks J. S., Wolfe M. S., Clarkson T. B., *Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17- β estradiol in ovariectomized monkeys.* *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1990. **10**(1051-7).
83. Wagner, C., St Clair, Schwenke, Shively, C. A. and Adams, *Estrogen and progesterone replacement therapy reduce low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus cynomolgus monkeys.* *J Clin Invest*, 1991. **88**(1995-2002).
84. Bjarnason, N.H., et al., *Raloxifene inhibits aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits.* *Circulation*, 1997. **96**(6): p. 1964-9.
85. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system.* *Free Radic Biol Med*, 2005. **39**(1): p. 1-25.
86. Maines, M.D., G.M. Trakshel, and R.K. Kutty, *Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible.* *J Biol Chem*, 1986. **261**(1): p. 411-9.

87. Wagener, F.A., et al., *Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(1): p. 416-23.
88. Conners, M.S., et al., *A closed eye contact lens model of corneal inflammation. Part 1: Increased synthesis of cytochrome P450 arachidonic acid metabolites*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(5): p. 828-40.
89. Wang, L.J., et al., *Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 711-20.
90. Juan, S.H., et al., *Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2001. **104**(13): p. 1519-25.
91. Wiesel, P., et al., *Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 3015-22.
92. Abraham, N.G., et al., *Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(6): p. H2468-77.
93. Hashiba, T., et al., *Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice*. Gene Ther, 2001. **8**(19): p. 1499-507.
94. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: update 2005*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(11-12): p. 1761-6.
95. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 583-650.
96. Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou, and L.C. Papadopoulou, *Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 327-45.
97. Applegate, L.A., P. Luscher, and R.M. Tyrrell, *Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 974-8.
98. Maines, M.D., *The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 517-54.
99. Nath, K.A., *Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues*. Kidney Int, 2006. **70**(3): p. 432-43.

100. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
101. Takahashi, T., et al., *Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(5): p. 867-77.
102. Hassall, C.J. and C.H. Hoyle, *Heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase in guinea-pig intracardiac neurones*. Neuroreport, 1997. **8**(4): p. 1043-6.
103. Dore, S., et al., *Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2445-50.
104. Zakhary, R., et al., *Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 795-8.
105. McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang, and M.D. Maines, *Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3*. Eur J Biochem, 1997. **247**(2): p. 725-32.
106. Naito, Y., T. Takagi, and T. Yoshikawa, *Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20 Suppl 1**: p. 177-84.
107. Wu, L. and R. Wang, *Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(4): p. 585-630.
108. Wunder, C. and R.F. Potter, *The heme oxygenase system: its role in liver inflammation*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2003. **3**(3): p. 199-208.
109. Kushida, T., et al., *Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation injury in endothelial cells*. J Cell Biochem, 2002. **87**(4): p. 377-85.
110. Kushida, T., et al., *TNF-alpha-mediated cell death is attenuated by retrovirus delivery of human heme oxygenase-1 gene into human microvessel endothelial cells*. Transplant Proc, 2002. **34**(7): p. 2973-8.
111. Stocker, R., A.N. Glazer, and B.N. Ames, *Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5918-22.
112. Abraham, N.G., et al., *Heme oxygenase-1 attenuates glucose-mediated cell growth arrest and apoptosis in human microvessel endothelial cells*. Circ Res, 2003. **93**(6): p. 507-14.
113. Quan, S., et al., *Expression of human heme oxygenase-1 in the thick ascending limb attenuates angiotensin II-mediated increase in oxidative injury*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1628-39.
114. Otterbein, L.E., et al., *Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury*. J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 1047-54.

115. Ryter, S.W., et al., *Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance*. Mol Cell Biochem, 2002. **234-235**(1-2): p. 249-63.
116. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. Science, 2008. **320**(5876): p. 667-70.
117. Zhang, F., et al., *Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(1): p. H350-8.
118. Foresti, R. and R. Motterlini, *The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis*. Free Radic Res, 1999. **31**(6): p. 459-75.
119. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
120. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.
121. Hartsfield, C.L., *Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(2): p. 301-7.
122. Ndisang, J.F., et al., *Induction of heme oxygenase-1 and stimulation of cGMP production by hemin in aortic tissues from hypertensive rats*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3893-900.
123. Ou, H.S., et al., *Role of endogenous carbon monoxide in the pathogenesis of hypotension during septic shock*. Sheng Li Xue Bao, 1999. **51**(1): p. 1-6.
124. Weiner, C.P., et al., *Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 5212-6.
125. Morschl, E., et al., *Estrogen-mediated up-regulation of the Ca-dependent constitutive nitric oxide synthase in the rat aorta and heart*. Life Sci, 2000. **68**(1): p. 49-55.
126. Rahimian, R., et al., *Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(1): p. 116-22.
127. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. Faseb J, 1995. **9**(13): p. 1319-30.
128. He, X.R., et al., *Effects of 17beta-estradiol on the baroreflex control of sympathetic activity in conscious ovariectomized rats*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. R493-8.
129. Braun-Dullaeus, R.C., M.J. Mann, and V.J. Dzau, *Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease*. Circulation, 1998. **98**(1): p. 82-9.
130. van der Giessen, W.J., et al., *Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1690-7.

131. Scheller, B., et al., *Addition of paclitaxel to contrast media prevents restenosis after coronary stent implantation*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(8): p. 1415-20.
132. Scheller, B., et al., *Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter*. N Engl J Med, 2006. **355**(20): p. 2113-24.
133. Scheller, B., et al., *Paclitaxel balloon coating, a novel method for prevention and therapy of restenosis*. Circulation, 2004. **110**(7): p. 810-4.
134. Finn, A.V., et al., *Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1500-10.
135. Speck, U., et al., *Neointima inhibition: comparison of effectiveness of non-stent-based local drug delivery and a drug-eluting stent in porcine coronary arteries*. Radiology, 2006. **240**(2): p. 411-8.
136. Hammerle, H., E. Betz, and D. Herr, *Human endothelial cells are stimulated and vascular smooth muscle cells are inhibited in their proliferation and migration by heparins*. Vasa, 1991. **20**(3): p. 207-15.
137. Hanke, H., et al., *Inhibition of cellular proliferation after experimental balloon angioplasty by low-molecular-weight heparin*. Circulation, 1992. **85**(4): p. 1548-56.
138. Hong, M.K., et al., *Paclitaxel coating reduces in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the Asian Paclitaxel-Eluting Stent Clinical Trial (ASPECT)*. Circulation, 2003. **107**(4): p. 517-20.
139. Sollott, S.J., et al., *Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1869-76.
140. Axel, D.I., et al., *Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 636-45.
141. Peyton, K.J., et al., *Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4443-8.
142. Morita, T., et al., *Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32804-9.
143. Aizawa, T., et al., *Balloon injury does not induce heme oxygenase-1 expression, but administration of hemin inhibits neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 302-7.
144. Duckers, H.J., et al., *Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 693-8.

145. Choi, B.M., et al., *Induction of heme oxygenase-1 is involved in anti-proliferative effects of paclitaxel on rat vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(1): p. 132-7.
146. Vittet, D., et al., *Nature and properties of human platelet vasopressin receptors*. *Biochem J*, 1986. **233**(3): p. 631-6.
147. Jard, S., *Mechanisms of action of vasopressin and vasopressin antagonists*. *Kidney Int Suppl*, 1988. **26**: p. S38-42.
148. Michell, R.H., C.J. Kirk, and M.M. Billah, *Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin*. *Biochem Soc Trans*, 1979. **7**(5): p. 861-5.
149. Mijatovic, V., et al., *Postmenopausal hormone replacement, risk estimators for coronary artery disease and cardiovascular protection*. *Gynecol Endocrinol*, 1999. **13**(2): p. 130-44.
150. Crofton, J.T., L. Share, and D.P. Brooks, *Pressor responsiveness to and secretion of vasopressin during the estrous cycle*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(6 Pt 2): p. R1041-8.
151. Spornitz, U.M., C.D. Socin, and A.A. Dravid, *Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium*. *Anat Rec*, 1999. **254**(1): p. 116-26.
152. Dogterom, J., T.B. van Wimersma Greidanus, and D. De Wied, *Vasopressin in cerebrospinal fluid and plasma of man, dog, and rat*. *Am J Physiol*, 1978. **234**(5): p. E463-7.
153. Jójárt, I., et al., *Hyponatremia and increased secretion of vasopressin induced by vincristine administration in rat*. *Exp.Clin.Endocrinol.*, 1987. **90**: p. 213-220.
154. Laczi, F., et al., *Osmoregulation of arginine-8-vasopressin secretion in primary hypothyroidism and in Addison's disease*. *Acta Endocrinol.(Copenh)*, 1987. **114**: p. 389-395.
155. Hunter, W.M. and F.C. Greenwood, *Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity*. *Nature*, 1962. **194**: p. 495-496.
156. Janáky, T., et al., *Iodination of peptide hormones and purification of iodinated peptides by HPLC*. *J.Lic.Chromatogr.*, 1982. **5**: p. 1499-1507.
157. Laczi, F., M. Fekete, and D. De Wied, *Antidiuretic activity and immunoreactive arginine-vasopressin levels in eye plexus blood during passive avoidance behavior in rats*. *Life Sci.*, 1983. **32**: p. 577-589.

158. Stallone, J.N., *Role of endothelium in sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 2): p. H2073-80.
159. Varga, C., et al., *Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat*. Eur J Pharmacol, 2007. **561**(1-3): p. 164-71.
160. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
161. Essig, D.A., D.R. Borger, and D.A. Jackson, *Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C59-67.
162. Whittle, B.J., et al., *Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta*. Br J Pharmacol, 2006. **147**(5): p. 575-82.
163. László, F.A., F. László, Jr., and D. De Wied, *Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(1): p. 73-108.
164. László, F.A., et al., *Difference between male and female rats in vasopressor response to arginine vasopressin*. Acta Physiol Hung, 1993. **81**(2): p. 137-45.
165. Pávó, I., et al., *Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats*. Eur J Pharmacol, 2000. **410**(1): p. 101-4.
166. Mori, T., et al., *Pharmacological profile of semotiadil fumarate, a novel calcium antagonist, in rat experimental angina model*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(1): p. 1668-72.
167. Nemcsik, J., et al., *Raloxifene lowers ischaemia susceptibility by increasing nitric oxide generation in the heart of ovariectomized rats in vivo*. Eur J Pharmacol, 2004. **495**(2-3): p. 179-84.
168. Gyongyosi, M., et al., *Platelet activation and high tissue factor level predict acute stent thrombosis in pig coronary arteries: prothrombogenic response of drug-eluting or bare stent implantation within the first 24 hours*. Thromb Haemost, 2006. **96**(2): p. 202-9.
169. Hell, X.R., et al., *Effects of 17beta-estradiol on the baroreflex control of sympathetic activity in conscious ovariectomized rats*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. R493-8.
170. Zoma, W.D., R.S. Baker, and K.E. Clark, *Coronary and uterine vascular responses to raloxifene in the sheep*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(3): p. 521-8.
171. Garcia-Villalon, A.L., et al., *Sex differences in the effects of 17 beta-estradiol on vascular adrenergic responses*. Eur J Pharmacol, 1996. **314**(3): p. 339-45.

172. Meyer, M.C., K. Cummings, and G. Osol, *Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators*. Am J Physiol, 1997. **272**(5 Pt 2): p. H2264-70.
173. Shan, J., et al., *Vascular effects of 17 beta-estradiol in male Sprague-Dawley rats*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H967-73.
174. Sudhir, K., et al., *Estrogen supplementation decreases norepinephrine-induced vasoconstriction and total body norepinephrine spillover in perimenopausal women*. Hypertension, 1997. **30**(6): p. 1538-43.
175. Belfort, M.A., et al., *The direct action of 17 beta-estradiol in isolated omental artery from nonpregnant and pregnant women is related to calcium antagonism*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **175**(5): p. 1163-72.
176. Ferrer, M., M. Meyer, and G. Osol, *Estrogen replacement increases beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries*. J Vasc Res, 1996. **33**(2): p. 124-31.
177. Kakucs, R., et al., *Direct relaxing effect of estradiol-17beta and progesterone on rat saphenous artery*. Microvasc Res, 1998. **56**(2): p. 139-43.
178. Hisamoto, K., et al., *Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3459-67.
179. Sullivan, T.R., Jr., et al., *Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2482-8.
180. Takahashi, K., et al., *Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells*. J Endocrinol, 2003. **178**(2): p. 319-29.
181. Bryant, K.a., *Selective estrogen receptor modulators*. Drug News Perspect, 1995. **8**(531-539).
182. Kocsis, J., E. Szabo, and F.A. Laszlo, *Serioangiographic study of renal cortical necrosis induced by administration of estrin and vasopressin in rats*. Invest Radiol, 1979. **14**(4): p. 295-9.
183. Kovacs, K., M.A. David, and F.A. Laszlo, *Effect of Hypophysectomy on the Development of Renal Cortical Necrosis Induced by Posterior Pituitary Extract in Oestrone Pretreated Rats*. Br J Exp Pathol, 1964. **45**: p. 415-8.
184. Stallone, J.N., *Sexual dimorphism in vascular reactivity to vasopressin (VP) in the rat mesenteric vasculature (MV)*. FASEB J., 1990. **4**: p. A706.
185. Crofton, J.T., et al., *The metabolic clearance rate of and pressor responses to vasopressin in male and female rats*. Endocrinology, 1986. **118**(5): p. 1777-81.

186. Gerhard, M. and P. Ganz, *How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench.* Circulation, 1995. **92**(1): p. 5-8.
187. Nevala, R., et al., *The effects of male gender and female sex hormone deficiency on the vascular responses of the rat in vitro.* J Physiol Pharmacol, 1996. **47**(3): p. 425-32.
188. Barton, M., J. Cremer, and A. Mugge, *17Beta-estradiol acutely improves endothelium-dependent relaxation to bradykinin in isolated human coronary arteries.* Eur J Pharmacol, 1998. **362**(1): p. 73-6.
189. Ferrer, M. and G. Osol, *Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity.* Endothelium, 1998. **6**(2): p. 133-41.
190. Jiang, C.W., et al., *Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro.* Br J Pharmacol, 1991. **104**(4): p. 1033-7.
191. Lekakis, J., et al., *Effect of long-term estrogen therapy on brachial arterial endothelium-dependent vasodilation in women with Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis.* Am J Cardiol, 1998. **82**(12): p. 1555-7, A8.
192. Ma, L., et al., *Effect of 17-beta estradiol in the rabbit: endothelium-dependent and -independent mechanisms of vascular relaxation.* J Cardiovasc Pharmacol, 1997. **30**(1): p. 130-5.
193. Darkow, D.J., L. Lu, and R.E. White, *Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP.* Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2765-73.
194. Guetta, V., et al., *The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women.* Circulation, 1997. **96**(9): p. 2795-801.
195. Lang, U., R.S. Baker, and K.E. Clark, *Estrogen-induced increases in coronary blood flow are antagonized by inhibitors of nitric oxide synthesis.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997. **74**(2): p. 229-35.
196. Wellman, G.C., J.E. Brayden, and M.T. Nelson, *A proposed mechanism for the cardioprotective effect of oestrogen in women: enhanced endothelial nitric oxide release decreases coronary artery reactivity.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996. **23**(3): p. 260-6.
197. Bhalla, R.C., et al., *Estrogen reduces proliferation and agonist-induced calcium increase in coronary artery smooth muscle cells.* Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1996-2003.
198. Prakash, Y.S., et al., *Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle.* Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. H926-34.

199. Davidge, S.T. and Y. Zhang, *Estrogen replacement suppresses a prostaglandin H synthase-dependent vasoconstrictor in rat mesenteric arteries*. *Circ Res*, 1998. **83**(4): p. 388-95.
200. Mugge, A., et al., *Contractile responses to histamine, serotonin, and angiotensin II are impaired by 17 beta-estradiol in human internal mammary arteries in vitro*. *Pharmacology*, 1997. **54**(3): p. 162-8.
201. White, R.E., D.J. Darkow, and J.L. Lang, *Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism*. *Circ Res*, 1995. **77**(5): p. 936-42.
202. Seely, E.W., et al., *Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women*. *Hypertension*, 1999. **33**(5): p. 1190-4.
203. Staessen, J.A., H. Celis, and R. Fagard, *The epidemiology of the association between hypertension and menopause*. *J Hum Hypertens*, 1998. **12**(9): p. 587-92.
204. Rosano, G.M., et al., *Short-term anti-ischemic effect of 17beta-estradiol in postmenopausal women with coronary artery disease*. *Circulation*, 1997. **96**(9): p. 2837-41.
205. Sbarouni, E., et al., *Estrogen replacement therapy and exercise performance in postmenopausal women with coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 1997. **79**(1): p. 87-9.
206. Stefanadis, C., et al., *Effect of estrogen on aortic function in postmenopausal women*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(2 Pt 2): p. H658-62.
207. Taskin, O., et al., *The effects of hormone replacement therapy on echocardiographic basic cardiac functions in postmenopausal women*. *Hum Reprod*, 1998. **13**(9): p. 2399-401.
208. Yim, S.F., et al., *Prospective randomized study of the effect of "add-back" hormone replacement on vascular function during treatment with gonadotropin-releasing hormone agonists*. *Circulation*, 1998. **98**(16): p. 1631-5.
209. Huang, A., et al., *Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats*. *Hypertension*, 1997. **29**(6): p. 1351-6.
210. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
211. Barouch, L.A., et al., *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms*. *Nature*, 2002. **416**(6878): p. 337-9.

212. Al-Shabrawey, M., et al., *Normal vascular development in mice deficient in endothelial NO synthase: possible role of neuronal NO synthase*. Mol Vis, 2003. **9**: p. 549-58.
213. Rosenfeld, C.R., et al., *Estrogen selectively up-regulates eNOS and nNOS in reproductive arteries by transcriptional mechanisms*. J Soc Gynecol Investig, 2003. **10**(4): p. 205-15.
214. Chambliss, K.L. and P.W. Shaul, *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 665-86.
215. Morishita, T., et al., *Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase*. Faseb J, 2002. **16**(14): p. 1994-6.
216. Everson, G.T., *Gastrointestinal motility in pregnancy*. Gastroenterol Clin North Am, 1992. **21**(4): p. 751-76.
217. Miller, V.M. and P.M. Vanhoutte, *Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. R1022-7.
218. Hayashi, T., et al., *Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11259-63.
219. Kauser, K. and G.M. Rubanyi, *Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 2): p. H2311-7.
220. Rubanyi, G.M., et al., *Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2429-37.
221. Hayashi, T., et al., *Effect of estrogen on isoforms of nitric oxide synthase: possible mechanism of anti-atherosclerotic effect of estrogen*. Gerontology, 1997. **43 Suppl 1**: p. 24-34.
222. Wellman, G.C., et al., *Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K+ channels*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1024-30.
223. Kneale, B.J., et al., *Vasoconstrictor sensitivity to noradrenaline and NG-monomethyl-L-arginine in men and women*. Clin Sci (Lond), 1997. **93**(6): p. 513-8.
224. Kawano, H., et al., *Gender difference in improvement of endothelium-dependent vasodilation after estrogen supplementation*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(4): p. 914-9.
225. Rahimian, R., et al., *Raloxifene enhances nitric oxide release in rat aorta via increasing endothelial nitric oxide mRNA expression*. Eur J Pharmacol, 2002. **434**(3): p. 141-9.

226. Sack, M.N., D.J. Rader, and R.O. Cannon, 3rd, *Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women*. *Lancet*, 1994. **343**(8892): p. 269-70.
227. Wassmann, S., et al., *Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production*. *Circulation*, 2002. **105**(17): p. 2083-91.
228. Ogita, H., et al., *Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(5): p. 998-1005.
229. Brosnihan, K.B., et al., *Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys*. *J Hypertens*, 1997. **15**(7): p. 719-26.
230. Veltman, J.C. and M.D. Maines, *Sex difference in adrenal heme and cytochrome P-450 metabolism: evidence for the repressive regulatory role of testosterone*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985. **235**(1): p. 71-5.
231. Tschugguel, W., et al., *Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2, and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor-mediated system*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(8): p. 3833-9.
232. Posa A, H.R., Petnehazy Ö, Petrasi Zs, Testor M, Glogar D and Gyöngyösi M, *Attainment of local drug delivery with paclitaxel-eluting balloon in porcine coronary arteries*. *Coronary Artery Disease* (inpress), 2008.
233. Alam, J., et al., *Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27694-702.
234. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
235. Chen, K. and M.D. Maines, *Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2000. **46**(3): p. 609-17.
236. Yu, R., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 39907-13.
237. Speck, U., et al., *Inhibition of restenosis in stented porcine coronary arteries: uptake of Paclitaxel from angiographic contrast media*. *Invest Radiol*, 2004. **39**(3): p. 182-6.