Ph.D. értekezés

Az ösztrogénhiány, elhízás és a szabadidős testmozgás hatásának vizsgálata állatkísérletes modellekben

Szabó Renáta

Témavezető:

Dr. habil. Varga Csaba

egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged

2017

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék ... 1

2. Rövidítések jegyzéke ... 3

3. Bevezetés ... 6

4. Irodalmi áttekintés ... 7

4.1. Az ösztrogén receptorok és szignalizációs mechanizmusok ... 7

4.1.1. Genomiális szignalizáció a kardiovaszkuláris rendszerben ... 8

4.1.2. Nem genomiális szignalizáció a kardiovaszkuláris rendszerben ... 10

4.2. Az ösztrogén gyulladáscsökkentő hatása ... 14

4.3. Az ösztrogén hatása a metabolikus folyamatokra ... 16

4.3.1. Az ösztrogén szerepe a perifériás szövetek modulációjában ... 16

4.3.2. Az ösztrogén szerepe a leptin modulációjában ... 19

4.4. Hormonális változások menopauzában ... 20

4.4.1. Az ösztrogénhiány, metabolikus változások és a kardiovaszkuláris rizikó összefüggése ... 21

4.4.2. Hormonpótlás menopauzában ... 24

4.4.3. Alternatív terápiás lehetőségek menopauzában- a testmozgás és a táplálkozás szerepe ... 25

5. Célkitűzések ... 27

6. Anyagok és módszerek ... 28

6.1. A természetes és kísérletes menopauza hatásainak vizsgálata ... 28

6.1.1. Vizsgált állatcsoportok ... 28

6.1.2. A TNF-α és IL-6 koncentráció meghatározása bal szívkamrában ... 29

6.1.3. A mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitásának meghatározása bal szívkamrában ... 29

6.1.4. Fehérjetartalom mérése Bradford mikromódszerrel ... 30

6.1.5. A hem-oxigenáz (HO) enzim aktivitásának meghatározása bal szívkamrában ... 30

6.1.6. A HO-1 és HO-2 expresszió meghatározása bal szívkamrában ... 31

6.1.7. Adrenalin és fentolamin által kiváltott experimentális angina modell (ST depresszió) ... 31

6.1.8. Statisztikai analízis ... 32

6.2. A kalória megvonás (CR), magas triglicerid tartalmú étrend (HT) és a szabadidős testmozgás hatásának vizsgálata reproduktív korú, illetve ösztrogénhiányos nőstényekben ... 32

6.2.1. Vizsgált állatcsoportok ... 32

6.2.2. A testtömeg meghatározása ... 33

6.2.3. Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT) ... 34

6.2.4. Az inzulin, leptin, triglicerid, aszpartát aminotranszferáz (AST) és az alanin aminotranszferáz (ALT) koncentrációjának meghatározása ... 34

6.2.5. Statisztikai analízis ... 35

7. Eredmények ... 36

7.1. A természetes és kísérletes menopauza hatásainak vizsgálata ... 36

7.1.1. A TNF-α és IL-6 koncentrációja bal szívkamrában ... 36

7.1.2. A MPO enzim aktivitása bal szívkamrában ... 37

7.1.3. A HO enzim aktivitása bal szívkamrában ... 37

7.1.4. A HO-1 és HO-2 izoformák expressziója bal szívkamrában ... 38

7.1.5. A HO enzim aktivitás- gátlás hatása a szívizom iszkémiára adrenalin+ fentolamin modellben (ST depresszió) ... 39

7.2. A kalóriamegvonás (CR), magas triglicerid tartalmú étrend (HT) és a szabadidős testmozgás hatásának vizsgálata reproduktív korú, illetve ösztrogénhiányos (OVX) nőstényekben ... 40

7.2.1. A testtömeg változása a 12 hetes kísérleti periódus kezdetén és végén SO és OVX nőstényekben ... 40

7.2.2. A vércukorszint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben 41

7.2.3. A szérum inzulin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben ... 44

7.2.4. A plazma leptin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben ... 46

7.2.5. A plazma triglicerid szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben ... 46

7.2.6. A plazma AST és ALT enzimek koncentrációja 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben ... 47

8. Diszkusszió ... 50

9. Következtetések ... 59

10. Összefoglaló ... 61

11. Summary ... 64

12. Irodalomjegyzék ... 67

13. Köszönetnyilvánítás ... 80

14. Tudományos közlemények listája ... 81

2. Rövidítések jegyzéke

AF-1, AF-2: ligand-független aktivációs funkció-1, ligand-független aktivációs funkció-2

Akt: protein kináz B

AMPK: AMP-aktivált protein kináz

ALT: alanin aminotranszferáz

AP 1: aktivátor protein 1

AST: aszpartát aminotranszferáz

AV csomó: atrioventrikuláris csomó

BK_{Ca}: kalcium-aktivált kálium csatorna

β-NADPH: β-nitoninamid-adenin-dinukleotid-foszfát

CA: katekolaminok

cAMP: ciklikus adenozin-monofoszfát

CBP: CREB-kötő fehérje

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CO: szén-monoxid

CR: kalóriamegvonás

CTRL: normál mennyiségű táp

CVD: kardiovaszkuláris megbetegedések

DBD: DNS-kötő domén

E: ösztrogén

EDH: endothelium eredetű hiperpolarizáció

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EGF: epidermális növekedési faktor

ERE: ösztrogén válasz elem

ERK: extracelluláris szignál által regulált kináz

eNOS: endothelialis nitrogénmonoxid-szintáz

ER-α, ER-β: ösztrogén receptor-alfa, ösztrogén receptor-béta

Fe^{2+}: szabad vasion

FFA: szabad zsírsav

FSH: follikulus stimuláló hormon

GLUT4: glükóz transzporter 4

GnRH: gonadotropin-felszabadító hormon

GPR30: G-fehérjéhez kapcsolt receptor 30

GRIP1: glükokortikoid receptor kölcsönható fehérje 1

H_2S: hidrogén-szulfid

HDL: magas denzitású lipoprotein

HO-1, HO-2, HO-3: hem-oxigenáz-1, hem-oxigenáz-2, hem-oxigenáz-3

HSL: hormon-szenzitív lipáz

HT: magas triglicerid tartalmú étkezés

ICAM-1: intracelluláris adhéziós molekula-1

IκB: inhibítor fehérje

iNOS: indukálható nitrogénmonoxid-szintáz

IL-6, -1β, -8, -10: interleukin-6, -1β, -8, -10

I/R: iszkémia/ reperfúzió

IRS-1: inzulin receptor szubsztrát-1

JNK: c-Jun N-terminális kináz

α2AR: α2 adrenerg receptor

L-Arg: L-arginin

LA: bal pitvar

LBD: ligand-kötő domén

LDL: alacsony denzitású lipoprotein

LH: luteinizáló hormon

LPL: lipoprotein lipáz

LV: bal kamra

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MPO: mieloperoxidáz

MS: metabolikus szindróma

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NAFLD: nem alkoholos zsírmáj

NASH: nem alkoholos steatohepatitis

NF-κB: nukleáris faktor kappa-B

nNOS: neuronális nitrogénmonoxid-szintáz

NO: nitrogén-monoxid

Ob: Obes gén

OGTT: orális glükóz tolerancia teszt

OVX: sebészi ovariektómia

P: foszforiláció

PGE_2: prosztaglandin E_2

PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz

PPARγ: peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma

POVX: farmakológiai ovariektómia

RA: jobb pitvar

RONS: reaktív oxigén és nitrogén gyökök

ROS: reaktív oxigén gyökök

RV: jobb kamra

SDS: nátrium dodecyl szulfát

sGC: szolubilis guanilát-cikláz

SA: sinuatrialis csomó

SMC: simaizomsejt

SnPP IX.: ón-protoporfirin IX.

SO: áloperáció

SOCS3: citokin jelző szupresszor 3

Sp 1: specifikus faktor 1

T2D: 2-es típusú diabétesz mellitusz

TF: transzkripciós faktor

TLR4: toll-like receptor 4

TNF-α: tumor nekrózis faktor-alfa

VCAM-1: vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1

VTA: ventrális tegmentalis area

3. Bevezetés

Fertilis korban a nők kardiovaszkuláris morbiditása és mortalitása alacsonyabb, mint az azonos korú férfiaké, a menopauza után azonban hasonló arány figyelhető meg nők és férfiak szív- és érrendszeri halálozásában. A rizikó növekedése nőkben közvetlen összefüggésbe hozható az ösztrogén hatásainak megszűnésével, mely a lipid és szénhidrát háztartást érintő változások eredményeként növeli a kardiovaszkuláris megbetegedések incidenciáját [10, 11]. Ösztrogénhiányt követően csökken a glükóztolerancia és inzulin érzékenység, változik a testösszetétel és a testzsír eloszlása, a posztmenopauzában levő nőknél viszcerális típusú elhízás jelentkezik [12]. Az elhízás a metabolikus szindróma (MS) kialakulásának központi tényezője, mely az alacsony intenzitású szisztémás gyulladásos folyamatok révén a sejtek kóros működését eredményezi [13]. A World Health Organization (WHO) felmérései alapján, 2014- ben a világ felnőtt lakosságának (18. életévüket betöltött személyek) ~39 %-a túlsúlyosnak és ~13 %-a elhízottnak bizonyult [14]. A nők átlagosan életüknek közel egyharmadát hormonhiányos állapotban töltik el, így rizikóstátuszuk befolyásolása kiemelt figyelmet érdemel a korai beavatkozásból származó előnyök miatt. A metabolikus és kardiovaszkuláris kockázati tényezők csökkentése döntő jelentőségű a posztmenopauzában levő nők életkilátásainak javításában. Az ösztrogénhiány következményeként gyakori a rizikótényezők halmozódása, így a terápiás megfontolások előtt nélkülözhetetlen az egyes kockázati tényezők fennállásának igazolása és hatásmechanizmusaik ismerete. A posztmenopauzális panaszok kezelése megvalósulhat gyógyszeresen, vagy nem-gyógyszeres eljárással, melynek alappillére a helyes életvitel kialakítása. A rendszeres fizikai aktivitás beiktatása mellett a megfelelő diétás kiegészítés kedvezően befolyásolja a metabolikus és kardiovaszkuláris paramétereket. A rendszeres testmozgás a lelki egészség számos aspektusában is javulást eredményez.

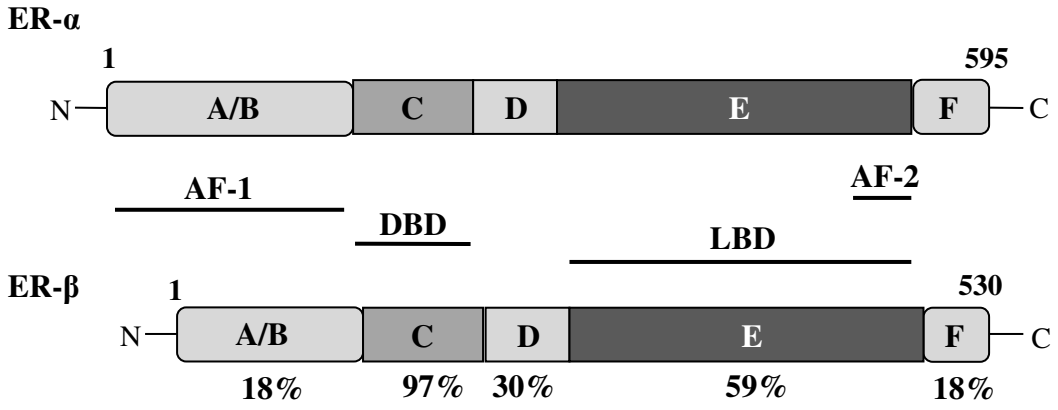
Az ösztrogénhiány és a helytelen életmód következtében kialakuló elhízás megelőzésére és kezelésére nemcsak egyéni, hanem társadalmi szinten is hangsúlyt kell fektetni.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az ösztrogén receptorok és szignalizációs mechanizmusok

Az ösztrogén biológiai hatásai rendkívül széleskörűek, melyek genomiális és nem genomiális szabályzó mechanizmusok révén érvényesülnek. A genomiális szignalizációs úttal szemben a nem genomiális úton másodperceken-perceken belül bekövetkező válaszreakciók figyelhetőek meg a sejtben, melyek túl gyorsak ahhoz, hogy fehérje szintézisen keresztül szabályozottak legyenek és a transzkripciós-transzlációs inhibítorok ne gátolják őket. A sejtmagban bekövetkező transzkripciós változások, illetve a citoszolban, akutan megjelenő kináz szignalizációs hatásmechanizmusok alapját az ösztrogén receptorához való kötődése képezi. Elkülönítünk klasszikus ösztrogén receptor (ER) formákat, illetve egy újszerű G-fehérjéhez kapcsolt receptort, a GPR30-at.

A klasszikus ER-nak két izoformája ismert, az ER- alfa (ER-α) és az ER-béta (ER-β). Mindkét ER izoforma hat funkcionális domént tartalmaz, melyből DNS-kötő doménjük konzervált, 97 %-os szekvencia azonosságot mutat, míg ligand-kötő doménjük aminosav szekvenciája 59 %-ban egyezik meg (1. ábra) [5].



1. ábra: Humán ösztrogén receptorok (ER-α és ER-β) sematikus rajza

DBD: DNS-kötő domén, LBD: Ligand-kötő domén, AF-1: Ligand-független aktivációs funkció 1, AF-2: Ligand-független aktivációs funkció 2

(Shao és mtsai., 2004, nyomán [5])

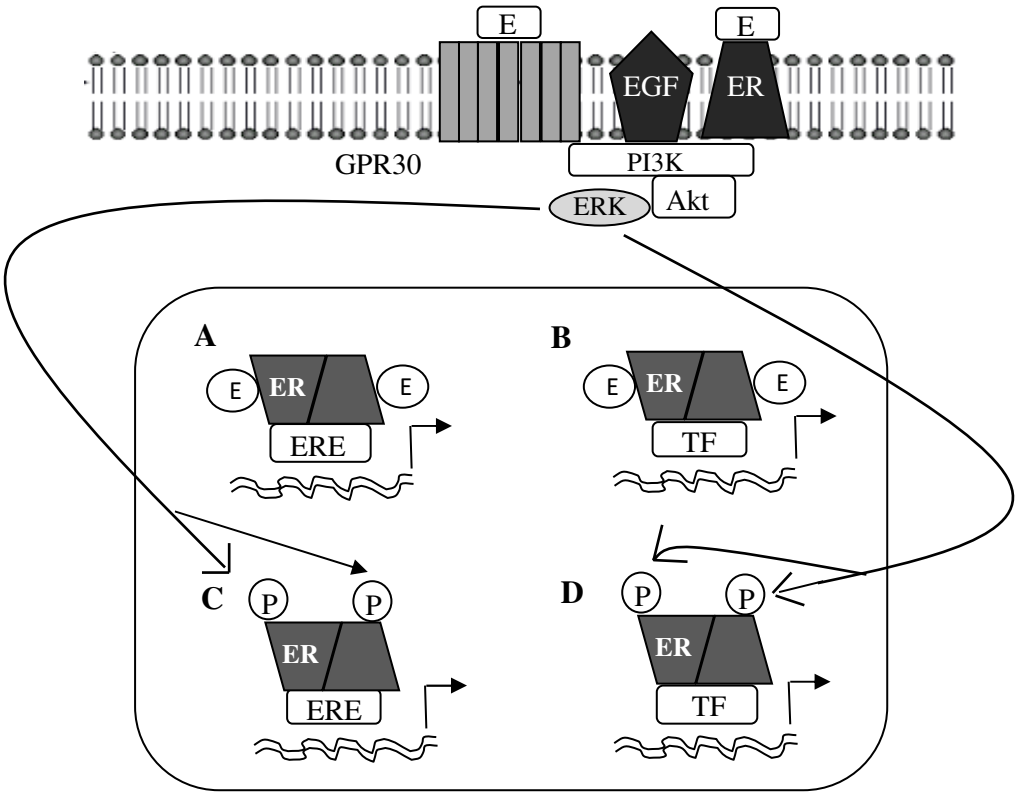
A két izoforma megközelítőleg azonos affinitással köti az ösztrogént, azonban transzkripciót szabályzó képességük és szöveti eloszlásuk eltérő, így feltehetően a különböző ER-ok eltérő biológiai funkcióval rendelkeznek. Tsutsumi és mtsai. vaszkuláris simaizom sejteket vizsgálva megfigyelték, hogy az ER-β izoformán keresztüli jelátvitel az indukálható nitrogénmonoxid- szintáz (iNOS) expressziójának növekedését eredményezi, míg az ER-α az iNOS gén átírását gátolja [15]. A különbség azonban nemcsak az ER-ok által mediált hatásokban tapasztalható, hanem magukban, az ER-ok expressziójában is jelentkezik. Különbségek figyelhetőek meg a nemek között, valamint premenopauzában-, illetve posztmenopauzában levő nők ER expressziójában. Gavin és mtsai. 30%-kal alacsonyabb endothelialis ER-α kifejeződést írtak le a premenopauza follikuláris fázisban, összehasonlítva azt a késői follikuláris fázis receptor arányával. További megfigyeléseik során, posztmenopauzában levő nőket vizsgálva 33 %-kal alacsonyabb ER-α expressziót detektáltak [16]. Az ER-ok expresszióját különböző hormonok (progeszteron, D vitamin) [17], az ER splice variánsai [18], valamint a transzkripciós elemek [19] is nagyban befolyásolják.

A GPR30 receptorok nagy része a sejtfelszínen található, azonban sejttípustól függően intracellulárisan is megjelennek az endoplazmatikus retikulumban vagy a sejtmagban lokalizálódva [20, 21]. Li és mtsai. a vaszkuláris funkció javulását a GPR30 általi endothelialis NOS (eNOS) aktivációjával támasztották alá [22].

4.1.1. Genomiális szignalizáció a kardiovaszkuláris rendszerben

A nukleáris ER-ok a génexpresszió módosításával hosszú távú hatásokat eredményezhetnek a kardiovaszkuláris rendszerben. Az ER-ok hatása megvalósulhat direkt, illetve transzkripciós faktorok (TF) általi indirekt kötődéssel is a DNS-hez, továbbá, ligand-független mechanizmusok által is. Az ER-ok által megvalósuló génaktivációs lehetőségeket a 2. ábra összegzi. A 2. A ábra az ER direkt kötődését jelöli a DNS-hez. Az ösztrogén az ER AF-2 doménjéhez kötődve az ER dimerizációját eredményezi. Az ER a DNS konszenzus ösztrogén válasz eleméhez (ERE) kapcsolódva módosítja a génexpressziót. Az ösztrogén-ER komplex különböző szabályzó elemek (ko-aktivátorok, ko-represszánsok) befolyásolása révén különböző hatást fejtenek ki a sejtben. Ismerünk azonban olyan géneket is, melyek nem tartalmaznak ERE-t. A mechanizmus egy transzkripcionális párbeszédként jellemezhető, mely során az ER transzkripciós faktor közvetítésével (aktivátor protein 1 (AP 1), specifikus faktor

1 (Sp 1)) által ködődhet a DNS-hez (2. B ábra). Továbbá, a génexpressziós változás ligand-független kötődéssel is megvalósulhat. A foszforilált ER a DNS ERE régiójához kötődve módosíthatja a génátíródást (2. C ábra) vagy akár transzkripciós faktorok segítségével, közvetett úton is kifejtheti hatását (2. D ábra). A ligand- független szignalizációs útvonal a gyenge ösztrogén- kötő képességgel rendelkező ER-ra jellemző [9].



2. ábra: Az ösztrogén receptorok által megvalósuló génaktivációs mechanizmusok

A: Közvetlen ER kötődés a DNS-hez az ösztrogén válasz elem (ERE) részvételével

B: Transzkripciós faktorok (TF) közreműködésével megvalósuló, indirekt ER kötődés a DNS-hez

C: Ligand-független kötés a DNS-hez

D: Ligand-független kötődés a DNS-hez TF-ok közreműködésével

Akt: protein kináz B, E: ösztrogén, EGF: eidermális növekedési faktor, ER: ösztrogén receptor, ERE: ösztrogén válasz elem, ERK: extracelluláris szignál által regulált kináz, GPR 30: G-fehérjéhez kapcsolt receptor 30, P: foszforiláció, PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz, TF: transzkripciós faktor

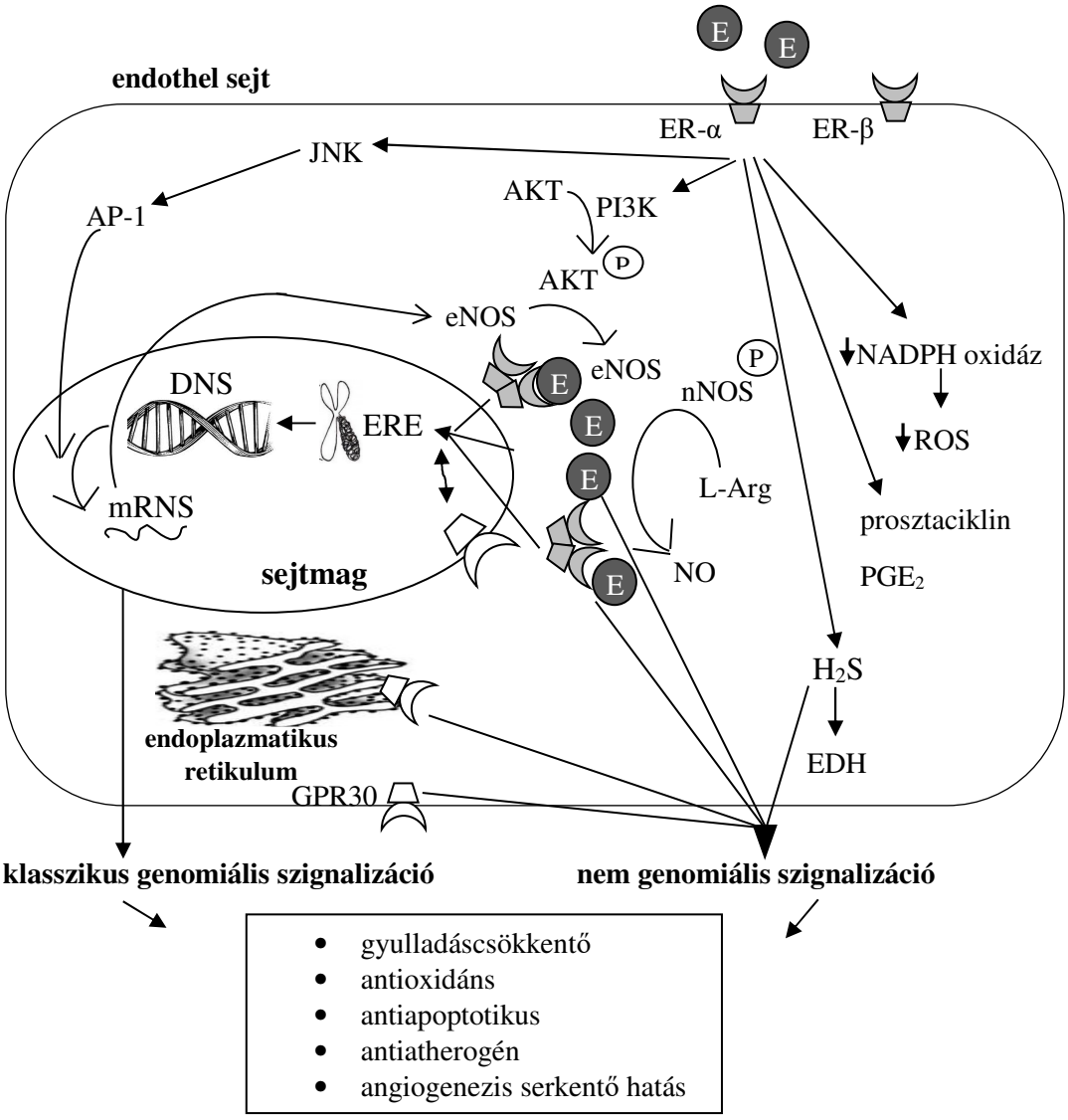
(Murphy és mtsai., 2011, nyomán [9])

4.1.2. Nem genomiális szignalizáció a kardiovaszkuláris rendszerben

Az ösztrogén gyors, nem genomiális úton megvalósuló szabályozási lehetőségét elsőként Szego és Davis írták le 1969-ben [23], azonban a teljes mechanizmus leírása még nem teljesen tisztázott. Kérdéses, hogy a klasszikus, citoplazmában/ sejtmagban jelen levő ER-α és ER-β megegyezik-e a plazmamembránba kihorgonyzott receptorok struktúrájával. A legtöbb tanulmány az ösztrogént kötő membrán receptoroknak a klasszikus ER-t, illetve annak valamilyen poszttranszlációs módosuláson átesett formáját feltételezi, ami pont a poszttranszlációs módosulás révén képes nem-genomiális szinten hatni és a plazmamembránban elhelyezkedni [24, 25]. Az ER-α nem genomiális szignalizációs útvonalai protektív hatást fejtenek ki a szív- és érrendszerben, azonban nem eredményeznek daganatos elváltozásokat a méhben, illetve az emlőkben. Ezen ismeretek igazolják, hogy az ösztrogénpótlást kísérő esetleges daganatos elváltozások az ösztrogén közvetítette nukleáris génexpressziós változásokkal magyarázhatóak. A nukleáris ER-α és ER-β izoformák, akár egymás működésére is hatva, gének aktiválásával és gátlásával szabályozzák azok kifejeződését [26]. Az ER-β- ról leírták, hogy gátló hatást fejt ki az ER-α- indukálta transzkripcióra és sejt proliferációra [27].

Az ösztrogén nem genomiális szignalizáció révén aktiválhatja a mitogén aktivált protein kináz (MAPK)/ extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK) és a foszfatidilinozitol 3- kináz (PI3K)/ protein kináz B (Akt) útvonalakat, valamint hozzájárulhat a másodlagos hírvivők szintjének (Ca^{2+} és ciklikus adenozin- monofoszfát (cAMP) intracelluláris növeléséhez [28]. A nem- genomiális hatások általában gyors, tranziens hatást váltanak ki, azonban meg kell jegyezni, hogy ezek a jelátviteli utak is végső soron génexpressziós változásokhoz vezethetnek, akár a klasszikus ER-on, vagy akár azoktól függetlenül hatva. Az endothel sejtekben történő ösztrogén közvetítette szignalizációs útvonalakat a 3. ábra összegzi [1]. A c-Jun N-terminális kináz (JNK) ER- mediált aktivációja az AP-1 sejtmagi transzkripciós faktor serkentése révén számos gén expresszióját szabályozza. Hasonlóan, az ER-α ERK 1/2 által szabályzott foszforilációja transzkripciós változások kialakulását eredményezheti [29]. Fiziológiás körülmények között az ösztrogén kulcsfontosságú szerepet játszik az erek vazorelaxációjában. Az ösztrogén a nitrogén- monoxid (NO) szignalizáció genomiális és nem genomiális útvonalainak szabályozása révén befolyásolja a vaszkuláris tónust és antiatherogén tulajdonsága révén szerepet játszik a kardioprotekcióban. Az ösztrogén az ER-α izoformán keresztül, a PI3K/ Akt nem genomiális szignalizációs útvonal aktiválásával emeli az

endothelium NO termelését. Az Akt aktiválja az eNOS foszforilációját, mely L-arginin- L-citrullin átalakulást követően NO felszabadulást eredményez [30]. Lekontseva és mtsai. ösztrogén- indukálta neuronális NOS (nNOS) aktivációt is igazoltak a vaszkuláris endotheliumban, melynek eredményeként az eNOS útvonallal megegyezően emelkedik a NO szint [31]. Az ösztrogén a prooxidáns nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz down-regulációjával csökkenti a reaktív oxigén és nitrogén gyökök (RONS) és szuperoxid ionok kialakulását, illetve a NO peroxinitritté történő átalakulását [32]. Összességében elmondható, hogy az ösztrogén által indukált genomiális és nem genomiális útvonalak által emelkedik a NO hasznosulása, mely a vazorelaxáció szabályozásán túl antioxidáns, antiapoptotikus és gyulladáscsökkentő hatásokkal egyaránt rendelkezik [1].



3. ábra: Az endothel sejtek ösztrogén szignalizációjának genomiális és nem genomiális útvonalai

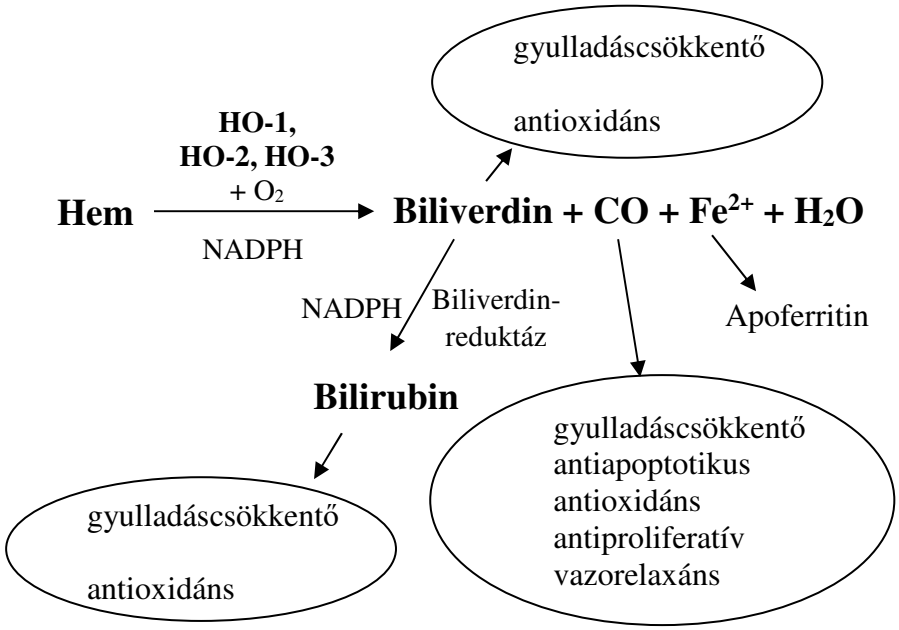
E: ösztrogén, ER-α: ösztrogén receptor-alfa, ER-β: ösztrogén receptor-béta, AP-1: aktivátor protein 1, JNK: c Jun N-terminális kináz, PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz, eNOS: endothelialis nitrogén-monoxid szintáz, nNOS: neuronális nitrogén-monoxid szintáz, NO: nitrogén monoxid, NADPH oxidáz: nikotinamid-adenin- dinukleotid-foszfát oxidáz, ERE: ösztrogén válasz elem, L-Arg: L-arginin, H_2S: hidrogén-szulfid, EDH: endothelium eredetű hiperpolarizáció, PGE_2: prosztaglandin E_2, GPR30: G- fehérjéhez kapcsolt receptor 30

(Chakrabarti és mtsai., 2014, nyomán [1])

A NO- rendszerről leírták, hogy kölcsönhat a hem- oxigenáz (HO) enzimrendszerrel [33]. A HO enzimrendszer tagjai a konstitutívan expresszálódó HO-2 és HO-3 izoformák, valamint az indukálható HO-1 (Hsp32) izoforma. A HO-1 expresszióját számos faktor emelheti. Ilyenek például a hem vagy annak oxidációs terméke a vas, illetve hemin [34], a ROS [35, 36], a hipoxia [37], az iszkémia/ reperfúzió (I/R) [38], a nyírófeszültség [39], valamint a NO [40] is. A HO-2 egy 36 kDa-os izoforma, melynek expresszióját az agyban, herében, májban, a bélidegrendszer myentericus plexus régiójában és az endotheliumban is igazolták [41]. A HO-3 egy pszeudogén, a HO-2 izoforma transzkriptje. Amellett, hogy a HO-3 90 %-os homológiát mutat a HO-2 enzimmel, a katalitikus aktivitása alacsonyabb [42]. Mind a HO-1, mind a HO-2 fontos szerepet játszik a hem lebontásában, a hem oxidációs mechanizmusuk során pedig ekvimoláris mennyiségű biliverdin, szén- monoxid (CO) és szabad vasion (Fe^{2+}) keletkezik. A biliverdint a citoszolban található biliverdin-reduktáz bilirubinná alakítja (4. ábra). A képződött bilirubin koncentrációja alapján toxikus-, illetve protektív hatással is bírhat. A bilirubin vérplazmában történő felszaporodása következtében csecsemőknél sárgaság alakulhat ki, melynek legsúlyosabb következménye a kernikterusz. Hiperbilirubinéma következtében a bilirubin lerakódik az agyszövet szürkeállományában, így irreverzibilis neurológiai károsodásokat okozhat [43]. Mreihil és mtsai. igazolták, hogy újszülöttek esetén a fotoizomerizáció 15 perccel a megvilágítást követően csökkenti a bilirubin szintet [44]. Normál koncentráció tartományban a konjugálatlan bilirubin a reaktív oxigén gyökök (ROS)-, NADPH oxidáz- és az adhéziós molekulák szintjének csökkentésével protektívnek bizonyult az oxidatív folyamatokkal szemben, így mind a biliverdin, mind pedig a bilirubin potenciális antioxidáns hatással bírnak [45, 46].

A szervezetben található CO termelődés HO-függő-, illetve HO-független útvonalon keresztül is megvalósulhat. A HO- független CO termelés a szerves molekulák autooxidációjával és fotooxidációjával történhet. A CO gyors felszabadulásáért azonban az indukálható HO-1 és a konstitutív HO-2 enzimek felelősek. Mind a CO, mind pedig a NOS enzimek által termelt NO a szervezet fontos szignálmolekulái, melyek részben egymás hatását modulálva, részben pedig más molekulákkal kölcsönhatva fejtik ki protektív hatásukat. Bizonyos körülmények között, ahol a NO szintje már magasabb, a CO gátolja a NO- közvetítette relaxációt. Más esetben, ahol a NO szintje alacsony, a CO a a szolubilis guanilát-cikláz (sGC) és ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) útvonalak stimulálásával elősegíti a vazodilatációt. A CO és NO együttes vazorelaxáns hatása a sGC és cGMP útvonalakon keresztül érvényesül. A CO vazodilatív hatása a cGMP útvonalon kívül a kalcium- aktivált kálium csatornák (BK_{Ca})

aktiválásával is megvalósulhat [47, 48]. Az antioxidáns és vazoaktív hatások mellett a HO-1-nek szerepe van az angiogenezisben és proliferációban is, valamint gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatással is bír. A CO gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatása a p38 MAPK útvonal szabályozásával érvényesül [49]. A szövetben felszaporodó CO több gyulladáskeltő mediátor molekulának a termelődését csökkentheti, mint például az interleukin-6 (IL-6), tumor nekrózis faktor-alfa (TNF-α) és IL-1β, valamint növeli a gyulladáscsökkentő válasz kialakulását az anti-inflammatorikus hatású IL-10 expressziójának emelésével [50]. A HO-1 az adhéziós molekulák, mint például a P-és E szelektin, vaszkuláris sejt adhéziós molekula-1 (VCAM-1) és az intracelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) elválasztásának csökkentésével védi a szövetet a gyulladás okozta sérülésektől [51]. A HO-1 antiproliferatív szerepét a vaszkuláris simaizomsejtekre gyakorolt hatásával bizonyították. HO indukciót követően, a felszabaduló endogén CO hatására megnő a sGC aktiváció és a cGMP szint, mely a sejtnövekedésre és sejtciklus szabályozásra kedvezően hatva védi a sejtet a proliferatív betegségekkel szemben [52].



4. ábra: A HO enzimek hatásmechanizmusa és a keletkezett végtermékek lehetséges hatásai

HO-1/HO-2/HO-3: hem-oxigenáz-1/ hem-oxigenáz-2/ hem-oxigenáz-3, NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát, CO: szén-monoxid, Fe^{2+}: szabad vasion

(Kappas és mtsai., 2008, nyomán [4])

4.2. Az ösztrogén gyulladáscsökkentő hatása

Az ösztrogén szerepet játszik mind az akut fázis, mind pedig a krónikus gyulladás válaszreakcióiban. Az akut gyulladásra adott válaszreakció során a lehető leggyorsabban igyekszik a bakteriális- és virális fertőzések csökkentésére, mellyel biztosítja a sejt túlélését. A krónikus gyulladás a makrofágok dominanciájával jellemezhető, melyek a toxikus ágensek termelésével szöveti károsodást okoznak. A krónikus gyulladás tartós fennállása kardiovaszkuláris és metabolikus rendellenességek kialakulásához vezethet, azonban az ösztrogén közvetítette válaszreakció csökkenti azon betegségek kialakulását és manifesztációját, melyek etiológiájában a gyulladásos folyamatok kulcsszerepet játszanak [53].

A nukleáris faktor kappa-B (NF-κB) a stresszre, fertőzésre és gyulladásra megjelenő válaszreakciók egyik fő komponense. Szinte az összes sejt citoplazmájában megtalálható, melyet egy inhibítor fehérje (IκB) kötődése tart inaktív állapotban. Aktiváló szignál hatására a NF-κB felszabadul az IκB kötődéséből, majd a sejtmagba transzlokálódva az IL-6 gén promoter régiójához kötődve serkenti a gyulladáskeltő citokinek expresszióját [54]. Az IL-1, IL-6 és TNF-α gének promoter régiója nem tartalmaz ERE-t, mely az ER transzkripciós faktorok közreműködésével megvalósuló génmódosítást jelenti. Az aktivált ER ezen módon kifejtett hatása az egyik legjobban tanulmányozott folyamat, azonban a ligand- aktivált ER és a gyulladáskeltő transzkripciós faktorok „párbeszédében" a gátló hatás pontos leírása még nem teljesen tisztázott. Az ER/ NF-κB kapcsolódás mindkét komponens konformáció változását idézheti elő és ezáltal gátlódik a DNS-hez való kötődés képessége. Ghisletti és mtsai. az ER-α NF-κB jelátviteli mechanizmusra kifejtett gátló hatását a PI3K nem-genomiális szignalizációs útvonal közreműködésével magyarázták [55]. Más elképzelések szerint az ER/ NF-κB kapcsolódás kofaktorok közreműködésével egy inaktív komplexet hoz létre a DNS-en és így gátolja a génátíródást. A p65 egy NF-κB fehérje, a p300 és a CREB-kötő fehérje (CBP) koaktivátor elemekkel kölcsönhatva fejti ki kompetitív gátló hatását. Ösztrogén- indukálta IL-6 down-regulációt ER-α és ER-β altípusokat külön- külön expresszáló sejtekben is megfigyeltek, így megállapítható, hogy mindkét ER szerepet játszhat az NF-κB jelátviteli úton keresztül megvalósuló IL-6 génátírás gátlásában [56].

A TNF-α génexpressziós szabályozás kulcseleme a TNF-α promoter régióján levő AP-1 hely. Az AP-1 a Jun fehérje család homodimereit vagy a Jun/ Fos család fehérjéinek

heterodimerjeit tartalmazza. Az ösztrogén az AP-1 mediálta transzkripció aktiválására és szupresszálására egyaránt képes. Az ER és az AP-1 hely között megvalósuló direkt interakció kialakulásában további promoter-kötő fehérjék játszhatnak kulcsfontosságú szerepet, mint például a glükokortikoid receptor kölcsönható fehérje 1 (GRIP1) vagy az ER ligand kötő doménjén levő AF-2 felszín [57]. A koaktivátorok kötődésével megvalósulhat az ösztrogén AP-1- függő TNF-α transzkripciójának gátlása [58].

Az ösztrogén és az IL-1 gyulladáskeltő citokin molekuláris interakciójának elemzésére kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. A NF-κB egy lehetséges szabályzó eleme lehet az IL-1 transzkripciónak, így feltételezhető, hogy az ösztrogén az IL-1 gátlásával megvalósuló gyulladáscsökkentő hatását az IL-6 transzkripció- gátló mechanizmushoz hasonlóan fejti ki [58].

4.3. Az ösztrogén hatása a metabolikus folyamatokra

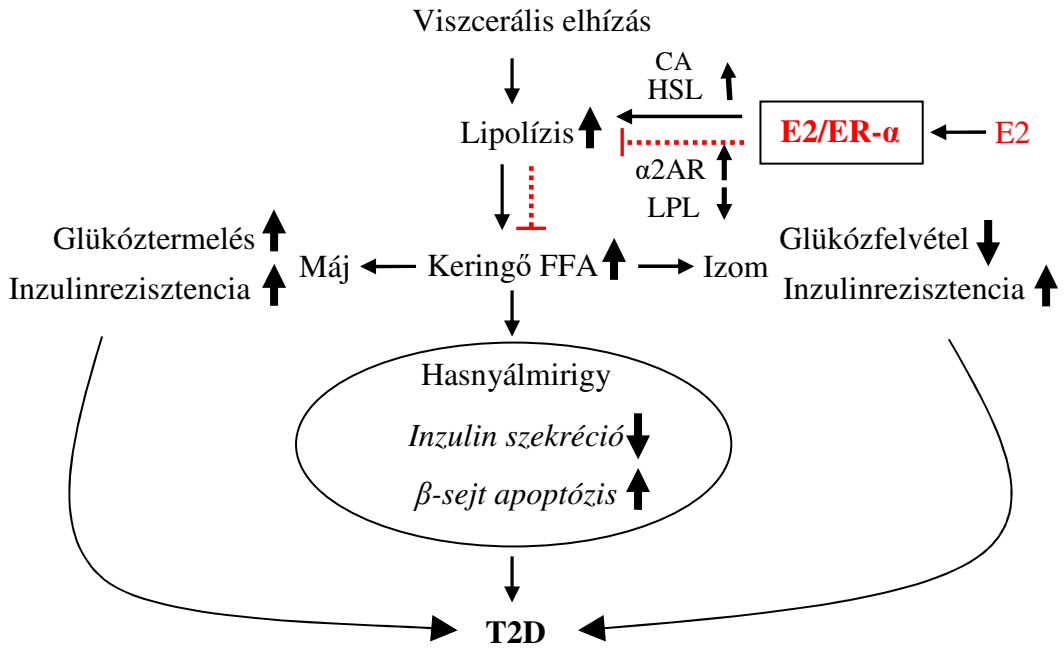
A metabolikus szindróma napjaink egyik leggyakoribb összetett anyagcserezavara. Tünetei között említhetjük az elhízást, diszlipidémiás zavarokat, hipertóniát, illetve a trombózisra-gyulladási folyamatok megjelenésére hajlamosító faktorok felhalmozódását, melyek fokozzák a kardiovaszkuláris rizikót, valamint a diabétesz mellitusz kialakulását [59]. A MS kórfolyamata multifaktoriális, azonban számos tanulmány igazolja, hogy a nemi hormonok jelenléte kulcsfontosságú szerepet játszik a betegség kialakulásában és manifesztációjában. Az ösztrogén mind a központi idegrendszer orexigén- és anorexigén projekció révén, mind pedig a perifériás szövetekre kifejtett hatásaival szerepet játszik az energia homeosztázis szabályozásában. Az ösztrogének homeosztatikus hatása az ER-α és ER-β izoformák közvetítésével valósul meg [60].

4.3.1. Az ösztrogén szerepe a perifériás szövetek modulációjában

A vázizomzat a szervezet inzulin- által indukált glükózfelvétel 75 %- ért felelős. Az inzulin-aktiválta glükózfelvétel folyamatának kezdő lépése az inzulin receptorához való kötődése. Az inzulin receptor ligand- indukálta tirozin foszforilációja az inzulin receptor szubsztrát- 1 (IRS-1) SH2 doménen keresztüli citoplazmatikus toborzásához vezet, mely a PI3K/ Akt és az

AMP- aktivált protein kináz (AMPK) jelátviteli útvonalakon keresztül a glükóz transzporter 4 (GLUT4) sejtmembránba történő kihelyeződését eredményezi. Az izomszövetben történő GLUT4 expresszió az inzulin- indukálta glükózfelvétel egy meghatározó lépése [61]. Az ösztrogén az inzulin jelátvitel fehérjéinek modulációjával, valamint a GLUT4 expressziójára- és transzlokációjára hatva egyaránt befolyásolhatja a sejt glükóz hasznosítását. Rogers és mtsai. normál glükóz homeosztázissal rendelkező patkányokat vizsgálva igazolták az ösztrogén stimuláló hatását az Akt-, AMPK és az Akt TBC1D1/4 szubsztrátjának foszforilációjában [62]. A vázizomban mindkét típusú ER jelenlétét igazolták.

A zsírszövet szerepet játszik a szénhidrát- és lipid- metabolizmusban is. A központi idegrendszerrel és perifériás szervekkel interakcióba lépve, autokrin és parakrin faktorok közreműködésével szabályozza saját funkcióját. A viszcerális elhízás következtében kialakuló metabolikus rendellenességek és az ösztrogén szabályzó mechanizmusainak kapcsolatát Kim és mtsai. összegezték (5. ábra) [8]. A lipolízis fokozódásával növekszik a keringő szabad zsírsavak (FFA) szintje, mely a glükóztermelés és glükózfelvétel kóros modulációja révén az máj- és izomsejtek inzulinrezisztenciáját eredményezi, továbbá károsítja a hasnyálmirigy inzulin szekrécióját és indukálja a β-sejtek apoptózisát. Az ösztrogén az α2 adrenerg receptorok up-regulációjával mérsékli a lipolízist, melynek eredményeként csökken a zsírsejtekből történő FFA mobilizáció. Az ösztrogén a lipoprotein lipáz (LPL) aktivitásának és expressziójának befolyásolásával szintén hozzájárul a FFA szint csökkentéséhez. A LPL a trigliceridekben gazdag lipoproteinek metabolizmusának kulcsenzime, mely szerepet játszik a lipoprotein partikulumokból történő FFA felszabadulás szabályozásában. Az ösztrogén a LPL modulációja mellett növeli a hormon- szenzitív lipáz (HSL) expresszióját. A folyamat meghatározó tényezője a katekolaminok jelenléte. Ösztrogén- kezelésen átesett egereket vizsgálva katekolaminok hiányában alacsonyabb lipolitikus aktivitást igazoltak, míg adrenalin kezelés hatására a lipolízis mértéke közel a duplájára emelkedett [63]. Az ösztrogén tehát azon pleiotróp hatásainak köszönhetően, mint például a lipoprotein lipáz aktivitásának csökkentése, a viszcerális zsírmennyiség redukálása, a centrális leptin- érzékenység fokozása, illetve az inzulin receptorok expressziójának növelése, védő szerepet játszik az elhízás és az inzulinrezisztencia kialakulásában [64].



5. ábra: A viszcerális elhízás és az ösztrogén-moduláció kapcsolata a szisztémás glükóz homeosztázis szabályozásában

E2: 17β-ösztradiol, ER-α: ösztrogén receptor-α, CA: katekolaminok, α2AR: α2 adrenerg receptor, HSL: hormon- szenzitív lipáz, LPL: lipoprotein lipáz, FFA: szabad zsírsav, T2D: 2-es típusú diabétesz mellitusz

(Kim és mtsai., 2014, nyomán [8])

Az ER-α és ER-β kifejeződését a szubkután és viszcerális zsírszövetben egyaránt detektálták. Az ER-α zsírszövetben betöltött protektív szerepét számos tanulmány igazolja, azonban az ER-β funkciója kevésbé ismert. ER-α génmódosított egerekben károsodott glükóz toleranciát, inzulinrezisztencia kialakulását, valamint a zsírsejtek hiperpláziáját és hipertrófiáját tapasztalták [65, 66]. Gallagher és mtsai. az ER-α gén polimorfizmusát kapcsolatba hozták a 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2D) kialakulásával és a zsírszövet mennyiségi változásával [67]. Az ER-β közvetítette hatásokat vizsgálva, Yepuru és mtsai. ösztrogénhiányos, elhízott egereknél testtömeg-, leptin- és glükóz szint csökkenést tapasztaltak ER-β agonista alkalmazását követően [68].

A hasnyálmirigy β-sejtjeinek sejtmagjában és sejtmembránjában szintén megtalálható mindkét ER izoforma [69]. ER-β -/- génmódosított egereket vizsgálva az inzulin- és glükóz szintekben nem történt változás, a szigetek mérete azonban növekedett, illetve glükóz-stimulációt követően csökkent az inzulin felszabadulás sebessége. Barros és mtsai.

eredményeivel alátámasztották, hogy az ER-β szerepet játszik a szigetméret- és az inzulin felszabadulás sebességének szabályozásában [70]. ER-α -/- egerekben hiperinzulinémia kialakulását és a szigetek funkciózavarát írták le [66].

4.3.2. Az ösztrogén szerepe a leptin modulációjában

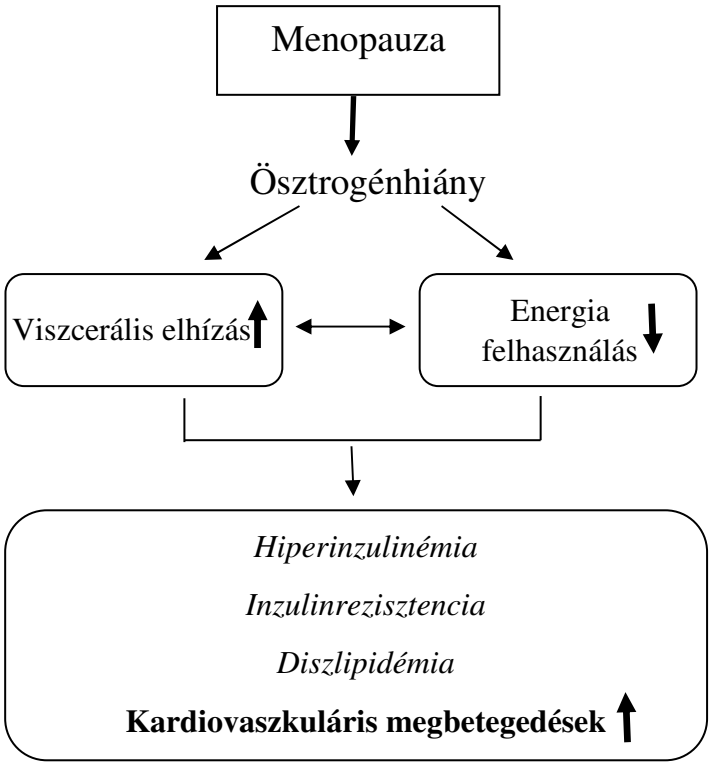
A leptin az energia homeosztázis egy olyan perifériás szabályzója, mely kapcsolatot teremt a zsírszövet, mint zsírraktár és a metabolikus folyamatok között. A leptin létezését 1994-ben írták le. A 167 aminosavból álló polipeptidet az obes (Ob) gén kódolja, expresszióját elsősorban az energiaraktárak helyzete és a zsírszövet mennyisége határozza meg [71]. Elsősorban a fehér zsírszövetben szintetizálódik, annak mennyiségével egyenes arányban termelődik és jut a keringésbe. A májra, tüdőre, vázizmokra, valamint a fehér- és barna zsírszövetre kifejtett perifériás hatásai mellett a központi idegrendszerben betöltött szerepe is sokrétű [72]. Az adipociták által termelt leptin saturabilis transzportmechanizmus révén átjut a vér-agy gáton, majd receptoraihoz kötődve a hipotalamusz nucleus arcuatus magcsoport neuropeptidjeivel szabályozza a táplálékfelvételt és az energia- felhasználást [73]. A leptin receptorok jelenlétét a ventrális tegmentalis area-ban (VTA) is igazolták, bizonyítva a leptin interakcióját a mezolimbikus dopaminerg jutalmazó rendszerrel. A VTA leptin receptorainak csökkenése növeli a táplálékfelvételt [74]. A leptin termelődését számos faktor stimulálhatja, mint például az inzulin, glükokortikoidok, pajzsmirigy hormonok, valamint az ösztrogén. Hím, illetve nőstény patkányoknál eltérő hatásokat figyeltek meg leptin-kezelést követően. Nőstények esetén az ösztrogén szerepet játszik a leptin érzékenység fenntartásában, valamint a testzsír-eloszlás szabályozásában. Ovariektomizált nőstény patkányok ösztrogén kezelését követően helyreállt a centrális leptin érzékenység, a testzsír eloszlás pedig hasonló arányokat mutatott az ovárium intakt nőstényekhez képest. [64]. Az ER-ok megtalálhatóak a hipotalamuszban is, így szerepet játszanak a táplálékfelvétel és a testsúly szabályozásában [75, 76]. Megfigyelték, hogy a nucleus arcuatus területén az ösztrogén szabályozza a leptin receptor génjének expresszióját. A leptin receptor, illetve az ER-α kiterjedt kolokalizációja arra enged következtetni, hogy a két receptor szoros interakció révén szabályozzák a viselkedésbeli és neuroendokrin folyamatokat [77]. A leptin szabályozás centrális és perifériás hatásai szoros összefüggést mutatnak. A lipolízis csökkenése, illetve a zsírsavak β-oxidációjának fokozódásával csökken a plazma triglicerid szint, mely a magas leptin

érzékenységnek köszönhetően alacsony leptin szintet tart fent a sejtben. Az adipociták által termelt leptin a zsírtömeg indikátora, így rendellenes működése vagy hiánya súlyos zavart okoz a táplálékfelvételben, valamint az energiaraktározásban és felhasználásban, növelve az elhízás kialakulásának valószínűségét.

4.4. Hormonális változások menopauzában

A menopauza reproduktív öregedési folyamattal járó állapot, mely a tüszők hormontermelésének csökkenését, majd teljes megszűnését jelenti. A petefészkek öregedése természetes és elkerülhetetlen biológiai folyamat, azonban a hormonhiányos állapot kemoterápiás kezelések következményeként, valamint sebészi- és farmakológiai beavatkozásokkal is kialakulhat [78]. A menopauza állapota 45-55 éves nők körében jelentkezik, melynek során emelkedik a follikulus stimuláló hormon (FSH) és a luteinizáló hormon (LH) szintje, míg az inhibin B és ösztrogén szintek alacsonyak. Fiziológiás körülmények között a FSH a petefészek granulosa sejtjeinek ösztrogén termelését szabályozza. Az ösztrogén három formában szintetizálódhat: ösztradiol, ösztron és ösztrol. A 17β- ösztradiol a premenopauza és perimenopauza leggyakoribb és leghatásosabb ösztrogén formája, míg posztmenopauzában a sokkal gyengébb ösztron jelenléte figyelhető meg. A menopauzát kísérő ösztrogén és inhibin B hormonok csökkenése mellett a progeszteron szint is csökken, mely a reproduktív élet során az endometrium szekréciós fázisba való előre léptetésével segíti a megtermékenyített petesejt beágyazódását [79].

A menopauzát kísérő ösztrogénszint csökkenésével metabolikus változások jelennek meg a szervezetben. A viszcerális elhízás, illetve az energiafelhasználás csökkenése elősegíti a hiperinzulinémia és diszlipidémia kialakulását, valamint az inzulin érzékenység zavarát eredményezi. A metabolikus rendellenességek önálló és együttes hatása fokozza a kardiovaszkuláris megbetegedések incidenciáját és manifesztációját [3] (6. ábra).



6. ábra: Az ösztrogénhiány metabolikus és kardiovaszkuláris hatása

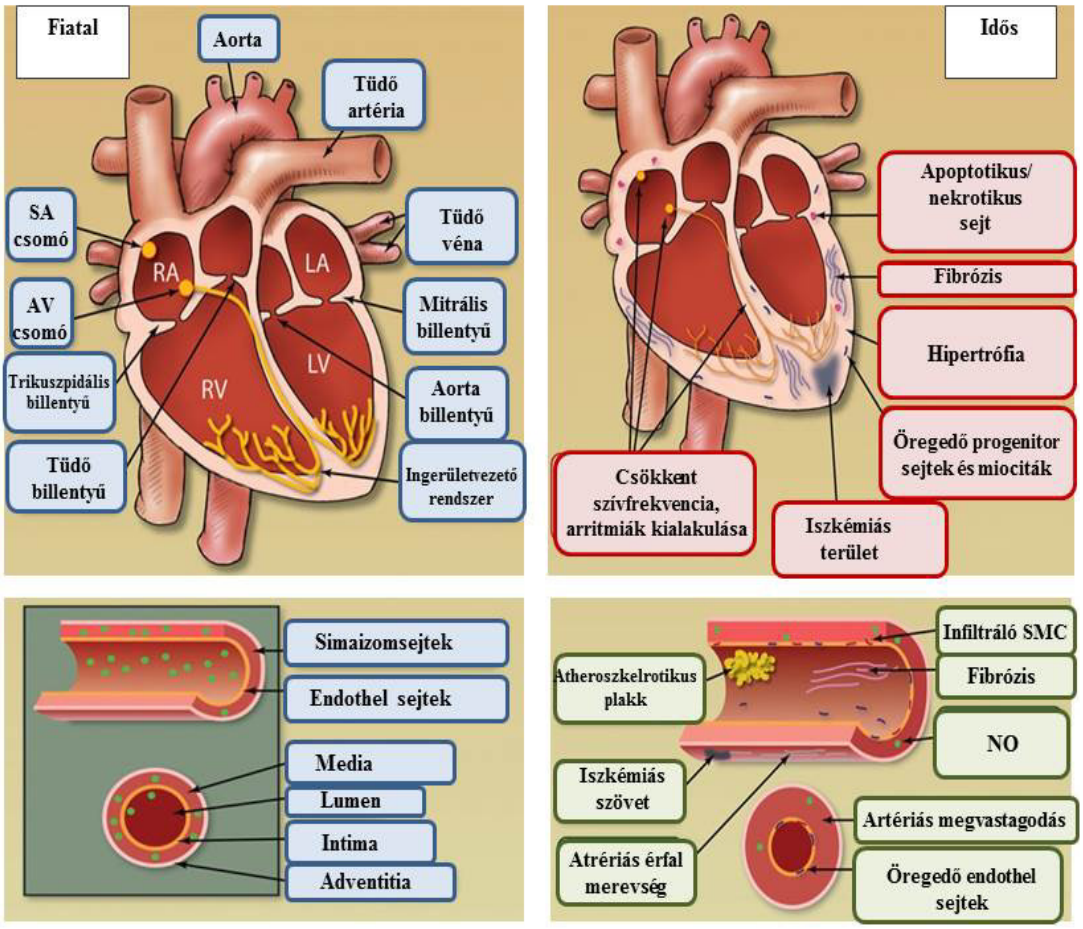
(Poehlman és mtsai., 2002, nyomán [3])

4.4.1. Az ösztrogénhiány, metabolikus változások és a kardiovaszkuláris rizikó összefüggése

Számos epidemiológiai tanulmány igazolja, hogy nőknél az ösztrogénhiány következtében változik a testösszetétel, tehát a zsírtömeg és a zsírmentes testtömeg aránya [14, 80]. A hasi területen kialakuló viszcerális elhízás az anyagcserezavarok közvetítésével károsítja az endotheliumot, hajlamosítva az érelmeszesedés, érszűkület és hipertónia kialakulását [81, 82]. A zsírszövet nem egyszerűen csak egy zsírraktár, hanem endokrin funkcióval is bír, mely az adipokinek termelésével és keringésbe juttatásával befolyásolja a szervezet lipid- és szénhidrát anyagcseréjét. A viszcerális zsírszövet aktívabb adipokin- termelő kapacitással rendelkezik, mint a szubkután zsírszövet, így a visceralis zsírfelszaporodás a MS és a kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) kialakulásának nagyobb kockázatát jelenti [83]. A zsírsejtekből felszabaduló adipokinek, valamint a keringésben levő lipidek és FFA-ak aktiválják a monocitákat és fokozzák a gyulladáskeltő citokinek szekrécióját. A reproduktív öregedéssel, illetve az ezzel társuló elhízás eredményeként mennyiségi és aktivitásbeli

változások jelentkeznek a leptin szintjében. Menopauzát követően, a zsírmennyiség növekedésével és a zsíreloszlásban történő változásokkal a leptin felszabadulás döntő hányada a viszcerális zsírszövetből történik. A leptin gyulladáskeltő adipokin szerepével gátolja az adipocita előalakok normál differenciálódását, csökkenti a zsírsejtek inzulin érzékenységét, továbbá fokozza a lipolízist. Ezen folyamatok eredményeként változik az izomsejtek glükózfelvevő képessége, valamint növekszik az inzulinrezisztencia kialakulásának valószínűsége [72]. Posztmenopauzában levő nőknél a testösszetétel és a lipid profil megváltozása, az ektópiás zsírlerakódás, valamint az emelkedett glükóz-, inzulin-, és leptin szint elősegítik a nem alkoholos zsírmáj (NAFLD) kialakulást. A NAFLD a népesség széles körét érintő betegség, előfordulása igen gyakori posztmenopauzális állapotban [84, 85]. Az ösztrogénhiány következtében fellépő metabolikus elváltozások fokozzák a kardiovaszkuláris rizikót.

A kor előrehaladtával számos fiziológiai folyamat progresszív csökkenése figyelhető meg, melyben a szív- és érrendszer is fokozottan érintett. A kardiovaszkuláris rendszer fő funkciója a szövetek oxigenizált vérellátása, így a szív-és érrendszert érintő patológiás elváltozások a szervezet egészében okozhatnak kóros következményeket. Az öregedési folyamatok a kardiovaszkuláris szövetekre hatva hipertrófiát okozhatnak, változhat a bal kamra (LV) diasztolés funkciója, csökkenhet a LV szisztolés reverz kapacitása, fokozódhat az artériás érfal merevség, illetve endothelialis diszfunkció is jelentkezhet. A szívet, illetve artériás rendszert érintő elváltozások egymásra hatva módosíthatják az egyes funkciókat. Az artériás érfali merevség fokozott megjelenésével LV hipertrófia és fibroblaszt proliferáció figyelhető meg, melynek eredményeként csökken a szív teljesítménye [86]. Az artériafal merevsége, illetve az endothelialis diszfunkció következményeként emelkedik a szisztolés vérnyomás és kockázati tényezőként szerepelnek az atheroszklerózis, magas vérnyomás és az agyi infarktus kialakulásában [87]. Az öregedéshez köthető patológiás elváltozások eredményeként csökken az endothel sejtek proliferációs és migrációs képessége szöveti sérülést követően [88]. Az endothel barrier rendszere porózussá válik, a vaszkuláris simaizomsejtek a szubendothelialis térbe vándorolva extracelluláris mátrix fehérjék lerakódásával érfal-megvastagodást okoznak [6] (7. ábra).



7. ábra: Az öregedés kardiovaszkuláris hatásai

SMC: simaizomsejt, AV csomó: atrioventrikuláris csomó, SA csomó: sinuatrialis csomó, RA: jobb pitvar, LA: bal pitvar, RV: jobb kamra, LV: bal kamra

(North és mtsai., 2012, nyomán [6])

A szív- és érrendszer egészségi állapotát a környezeti tényezők, kiemelten a táplálkozási szokások és a testmozgás rendszeressége is nagymértékben befolyásolják. Számos olyan kockázati faktort (elhízás, inzulinrezisztencia, stressz, gyulladás) ismerünk, melyek prevalenciája nemcsak az öregedési folyamatok során növekszik, hanem a MS kialakulásának hajlamosító tényezője. Az elhízás velejárójaként nő a gyulladásos adipokinek szekréciója, valamint atherogén rizikófaktorok jelennek meg a keringésben, melyek növelik a CVD prevalenciáját [89]. Az öregedés a MS és a CVD etiológiájában kulcsfontosságú, azonban

összefüggéseket *vice versa* találhatunk, mivel a MS és a CVD gyorsítják az öregedési folyamatokat.

4.4.2. Hormonpótlás menopauzában

A menopauzát kísérő ösztrogénhiányos állapot morbiditásra és mortalitásra gyakorolt hatása intenzív kutatás alatt áll. A tünetek és késői szövődmények kezelésére vonatkozóan számos utalást találunk a szakirodalomban, azonban a terápiás alkalmazások szervezetre gyakorolt hatásai megosztóak. Az hormonpótló kezelés megoldható lenne ösztradiol tartalmú készítményekkel, azonban a nagy dózisú ösztrogén- monoterápiával kapcsolatos vizsgálatok egyértelműen igazolják a kezelés onkogén hatását. A hosszú távú, nagy dózisú ösztrogén terápia sejtproliferációban betöltött szerepével fokozza az emlőrák, valamint az endometrium karcinóma kialakulásának kockázatát [90]. Az endometrium hiperplázia és karcinóma kockázatának csökkentése céljából az ösztrogénkezelést progesztogénnel egészítik ki. Az ösztrogén- progesztogén kezelésről szóló vizsgálati eredmények ellentmondóak. A különböző progesztogének eltérő hatásprofiljuk eredményeként az ösztrogén- progesztogén terápia különböző klinikai következményekkel járhat [91, 92]. A progeszteron származékok hatásának vizsgálata során az is felmerült, hogy a kombinált hormonpótló terápia negatívan befolyásolhatja az ösztradiol kardiovaszkuláris védő hatásait, azonban az erre irányuló irodalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak [93-95].

A posztmenopauzális szövődmények kezelése szempontjából a szelektív ösztrogén receptor-modulátorok felfedezése és gyógyszerként történő alkalmazása nagy jelentőséggel bír. A raloxifen egy nem szteroid természetű benzotiofén vegyület, mely ösztrogén- szerű hatást fejt ki a csontszöveten és kardiovaszkuláris hatásai is hasonlóak az ösztradioléhoz, azonban nem stimulálnak olyan szöveteket, mint az endometrium vagy az emlők, ahol az ösztrogének onkogén hatásúak lehetnek. A raloxifen kardiovaszkuláris védőhatása részben azon alapul, hogy kedvezően befolyásolja a szív- és érrendszeri megbetegedésekben szerepet játszó rizikófaktorokat, így csökkenti az alacsony denzitású lipoprotein (LDL)- koleszterin szintet, illetve protektívnek bizonyul az abdominális elhízással szemben [96, 97]. Munkacsoportunk korábbi eredményeivel igazolta, hogy a raloxifen az ösztrogénhez hasonlóan szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszer védelmében. A raloxifen a HO enzimrendszer modulációjával is csökkenti a kardiovaszkuláris rizikót [59, 98].

4.4.3. Alternatív terápiás lehetőségek menopauzában- a testmozgás és a táplálkozás szerepe

A testmozgás hiánya, a helytelen táplálkozási szokások, valamint az öregedési folyamatokhoz köthető egyéb elváltozások tovább veszélyeztetik a menopauzába lépő nők egészségi állapotát. Az ösztrogénhiány már önmagában kedvezőtlen hatással bír a zsíreloszlásra, a lipid és szénhidrát háztartásra, valamint fokozza a kardiovaszkuláris rizikót. Az energiadús táplálkozás és a testmozgás hiánya növeli az elhízás mértékét, mely a sejtek kóros működését eredményezi. A viszcerális elhízás következtében fokozódik az inzulinrezisztencia, a T2D és a hipertónia kialakulása, valamint a vérzsírok szintjének atherogén irányba való eltolódása figyelhető meg. Az elhízás kezelése többet jelent, mint maga a súlycsökkentés, célja az általános egészségi állapot javítása és a szövődmények kezelése. A rendszeres fizikai aktivitás testsúlycsökkentő hatásai mellett a zsírarány csökkentésével, illetve az izomtömeg növelésével pozitívan befolyásolja a posztmenopauzában levő nők testösszetételét [99]. A rendszeres testmozgás által indukált adaptációs mechanizmusok speciális szignalizációs utak aktiválásával és/ vagy gátlásán keresztül szabályozzák a testmozgás- okozta génexpressziós változásokat. Az adaptációs mechanizmusok befolyásolják a szénhidrátok és lipidek mobilizációjában, transzportjában és oxidációjában, valamint a mitokondriális biogenezisben szerepet játszó gének expresszióját [100]. A rendszeres testmozgás a kardiovaszkuláris rizikófaktorok csökkentésével és a vaszkuláris funkcióra kifejtett pozitív hatásai révén nőkben és férfiakban, minden korosztály számára protektív és preventív hatású. Számos tanulmány igazolja, hogy a posztmenopauzában levő nők körében a testmozgás az össz-koleszterin-, triglicerid- és az LDL-koleszterin szintjének csökkentésével, a magas denzitású lipoprotein (HDL) szint emelésével javítja a glikémiás kontrollt [101, 102]. A testmozgás antioxidáns és anti-atherogén hatásai révén megfelelő terápiás módszer a metabolikus rendellenességek és a CVD kezelésében [103, 104]. A rendszeres testmozgás nemcsak a testre, hanem a mentális egészségre is pozitívan hat, megelőzhető a depresszió, javítja a hangulatot és az általános közérzetet.

A menopauzában levő nők életkilátásait a kalóriabevitel csökkentése/ kalóriamegvonás (CR) jelentősen javíthatja. Elsőként McCay és mtsai. bizonyították, hogy a kalóriamegvonás összefüggésbe hozható az élettartam meghosszabbításával a szervezetre gyakorolt jótékony hatásai révén [105]. A 20-50 %-os kalóriamegvonás a megfelelő tápanyagbevitel mellett növeli az élettartamot és csökkenti a metabolikus rizikófaktorok jelenlétét, illetve protektívnek bizonyul a keringési megbetegedésekkel szemben [106, 107]. A kalóriabevitel

redukálása csökkenti a triglicerid- és LDL szintet [108], illetve pozitív hatással bír a gyulladásos folyamatokkal szemben, mivel csökkenti a TNF-α, IL-6 és a C reaktív protein gyulladásos markerek koncentrációját, illetve az NF-κB aktivációját [109, 110]. A lipid profilra kifejtett kedvező hatások eredményeként csökken a kardiovaszkuláris rizikó kialakulása [111]. A CR kardioprotekcióban betöltött szerepe génexpressziós változások szintjén is igazolt [112, 113]. A CR és az élettartam közötti pozitív korreláció mindaddig igazolt, míg a CR nem eredményez éhezést, ezért a CR időbeni és mennyiségbeli alkalmazását körültekintően kell meghatározni az egyén egészségi állapotától függően [114]. Az életkor előrehaladtával fokozódik az oxidatív sérülések mértéke, melyben az oxigén-felhasználó metabolikus útvonalak által termelt ROS kulcsfontosságú. A ROS döntő részének képződéséért a mitokondrium felelős. Bevilacqua és mtsai. rövid (kéthetes, illetve két hónapos periódus) - és közepes időtartamú (hat hónapos periódus) CR hatásait vizsgálták a ROS termelődésének tekintetében. 40 %-os CR-t követően mindhárom CR időtartam a mitokondriális funkció javulását, illetve az oxidatív stressz csökkenését eredményezte. A ROS jelenlétét és az oxidatív károsodás mértékét a hidrogén-peroxid termelődésével vizsgálták, melynek értékét mind a rövid- mind a közepes időtartamú CR pozitívan befolyásolta. A CR az oxidatív folyamatok csökkentésével szerepet játszik az élettartam növelésében [115].

5. Célkitűzések

A posztreproduktív időszak hormonszint csökkenését kísérő zavarok krónikus elváltozásokhoz vezethetnek, melyek az életkor előrehaladtával a legfőbb morbiditási és haláloki tényezőként szerepelnek. A menopauzát követő kockázati tényezők mellett azonban az életmóddal összefüggő újabb rizikófaktorok jelentőségével is számolnunk kell, melyek a posztmenopauzában levő nők életkilátásait döntően befolyásolják.

1. Az első kísérletsorozatunkban arra kerestük a választ, hogy a természetes öregedési folyamattal járó ösztrogénhiány, illetve a kísérletes menopauza milyen változásokat idéz elő.

   Tisztázni kívántuk, hogy:

   - Milyen különbségek mutatkoznak a természetes úton kialakuló ösztrogénhiányos idős nőstények és a kísérletes menopauza állatmodelljeiben a gyulladásos paraméterek tekintetében, a HO enzimek aktivitásában és expressziójában, továbbá hogy miképpen változik a szívizom iszkémiára való hajlam?

2. A második kísérletsorozatunkban célul tűztük ki, hogy az életmód (táplálkozás és testmozgás) metabolikus hatásait vizsgáljuk fertilis és ösztrogénhiányos nőstényekben.

   Tisztázni kívántuk, hogy:

   - Hogyan módosulnak a metabolikus paraméterek az ösztrogénhiány és/vagy a különböző táplálkozási szokásoknak (normál, magas triglicerid tartalmú táplálkozás, kalóriamegvonás) köszönhetően?

   - A rendszeres, szabadidős testmozgás és a kalóriamegvonás, mint nem farmakológiás kezelési lehetőségek, önállóan és együttesen milyen változásokat idéznek elő ovariektomizált és fertilis nőstények metabolikus értékeiben?

6. Anyagok és módszerek

6.1. A természetes és kísérletes menopauza hatásainak vizsgálata

6.1.1. Vizsgált állatcsoportok

A menopauzát kísérő ösztrogénhiányos állapot hatásainak elemzéséhez állatkísérletes vizsgálati modelleket dolgoztunk ki. Ivarérett, nem terhes nőstény Wistar patkányokon (Toxi-Coop Zrt., Magyarország, a kísérlet kezdetekor 10 hetes, 180-200 g testtömegű) sebészi- (OVX) vagy farmakológiai (POVX) ovariektómiát hajtottunk végre. A POVX csoportba tartozó nőstényeket az ösztrogénhiányos állapot elérése céljából 4 hetente 750 µg/ttkg dózisú gonadotropin- felszabadító hormon (GnRH) analóg- triptorelin (Decapeptyl Depot®, Ferring) injekcióval kezeltük intramuszkulárisan. A triptorelin a folyamatos szérumszintet biztosító adagolás esetén az OVX-hez hasonló szexuálszteroid szérumszintet eredményezve gátolja az ováriumok működését [116]. A Decapeptyl Depot® injekció 28 napon át biztosítja a kívánt hatás elérését.

Az OVX csoportba tartozó nőstényeken bilaterális sebészi ovariektómiával (OVX), sebészi úton távolítottuk el mindkét oldali petefészket. A petefészkek eltávolítását követően a sebbe az esetleges fertőzések elkerülése végett penicillint szórtunk.

A kísérletünk kontroll csoportjába áloperált (SO), ivarérett nőstények tartoztak. Az áloperálás során az állatok hasfalát felnyitottuk, azonban a petefészkeket nem távolítottuk el, sértetlenül maradtak. Az áloperációt és OVX műtéti eljárást követően az állatok 4 hetes pihenőfázis során regenerálódtak.

A természetes menopauza hatásainak vizsgálatára 24 hónapos ovárium-intakt nőstény Wistar patkányokat használtunk.

Az állatokat standard körülmények között (hőmérséklet, világítás, páratartalom) tartottuk, csapvizet *ad libitum* kaptak és standard granulált patkánytápot fogyasztottak. A kísérleteink során felhasznált állatok tartása és felhasználása az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU előírásainak alapján, a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998) és a 40/2013. II. 14. kormányrendeletnek megfelelően történt.

A kísérlet során vizsgált csoportok:

- ~ 4 hónapos, áloperált, SO (=kontroll) fertilis nőstények
- ~ 4 hónapos, farmakológiai ovariektómián (POVX) átesett nőstények
- ~ 4 hónapos, sebészi ovariektómián (OVX) átesett nőstények
- 24 hónapos, ovárium-intakt, idős nőstények

6.1.2. A TNF-α és IL-6 koncentráció meghatározása bal szívkamrában

A gyulladáskeltő citokinek meghatározása ELISA (Quantikine patkány TNF-α és IL-6 ELISA kit, R&D Systems Inc.) módszerrel történt bal szívkamrából. Mintáinkat foszfát pufferben homogenizáltuk (pH 7.4) Ultra-Turrax homogenizáló segítségével (2 x 30 sec), majd 1000 g-vel 20 percig 4 ^{o}C-on centrifugáltuk. A kísérlet kezdő lépéseként minden lyukba 50 µl-t piettáztunk az RD-41-es oldatból, majd 50 µl standardot, mintát vagy kontrollt. Szobahőmérsékleten, ELISA plate rázó segítségével végzett 2 órás inkubáció után a plate-et 5x mostuk, minden esetben 400 µl mosóoldattal. Ezután 100 µl TNF-α/ IL-6 konjugátumot adagoltunk és ismét szobahőmérsékleten 2 óráig tartó inkubáció következett. Az ismételt mosási folyamat befejeztével a reakciót 100 µl STOP oldattal állítottuk le, majd az optikai denzitást 450 nm-en mértük ELISA reader (Benchmark Microplate reader; Bio-Rad) segítségével. A TNF-α és IL-6 értékeket pg/mg fehérjeként fejeztük ki.

6.1.3. A mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitásának meghatározása bal szívkamrában

A MPO enzim mennyisége a neutrofil granulociták infiltrációjakor megemelkedik, mennyisége a gyulladás mértékével korrelál. A minták homogenizálását 0,5 % hexadeciltrimetilammónium–bromidot tartalmazó foszfát pufferben (50 mM, pH 6,0) végeztük. A szív balkamrát hideg pufferben, Ultra-Turrax homogenizáló segítségével (2 x 30 másodpercig; 13 500 rpm) homogenizáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 37 ^{o}C-os vízfürdőben felolvasztottuk. A fenti folyamatot még kétszer megismételtük. Ezt követően a mintáinkat 5000 g-vel 15 percig 4 ^{o}C-on lecentrifugáltuk és a felülúszót használtuk a mérésekhez. Az MPO méréseinkhez peroxidázt használtunk standardként (0; 0,0125, 0,025, 0,05, 01, 02, 03, 04, 05 U/ml). A mérés során 96 lyukú plate-

be tettünk 280 µl O-dianisidin-diHCl-t (0,167 mg/1 ml foszfát puffer). Ehhez adtunk a felülúszónkból vagy a standardunkból 12 µl-t és a reakciót 10 µl 0,03 %-os hidrogén-peroxiddal indítottuk. 90 másodperces rázatás után 490 nm-en ELISA reader (Benchmark, BIO-RAD) segítségével mértük a kialakult színváltozásokat. Eredményeinket mU/mg fehérjére vonatkoztattuk [117].

6.1.4. Fehérjetartalom mérése Bradford mikromódszerrel

A fehérjemérés során a standard sorunkat marha szérum albumin (bovine serum albumin, BSA) desztillált vízzel történő hígításával állítottuk össze (0-12 µg BSA). Mintáinkból a szükséges hígítást követően 20 µl-t pipettáztunk 980 µl desztillált vízhez, ezután mind a standard sorhoz, mind pedig a mintáinkhoz 200 µl Bradford reagenst adtunk. Az optikai denzitás 595 nm-en mértük, eredményeinket µg fehérje/ ml koncentrációban kaptuk meg.

6.1.5. A hem-oxigenáz (HO) enzim aktivitásának meghatározása bal szívkamrában

Az állatokon cervikális diszlokációt végeztünk, majd az eltávolított bal kamra szöveteket jégen tartott pH 7.4 -es, 10,0 mM N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etánszulfonát (HEPES), 32,0 mM szacharóz, 1,0 mM dithiotreitol, 0,10 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 10,0 µg/ml tripszin inhibítor, 10,0 µg/ml leupeptin és 2,0 µg/ml aprotonin tartalmú elegyben homogenizáltuk (Ultra Turrax T25; 13500 min-1; 2x30 s). Az 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 $MgCl_2x6H_2O$–ot és 100,0 mM KH_2PO_4–ot tartalmazó reakcióelegyhez 150,0 µl-nyi, centrifugálással (20 perc, 15000 g, 4 °C) nyert felülúszót adtunk. A reakció elindításához 100,0 µl ß-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (β-NADPH) 150,0 µM adtunk a mintákhoz, majd sötétben, 37 °C-on inkubáltuk 60 percen keresztül. A reakció leállítása 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 HO enzim aktivitás egységét a következőképpen adtuk meg: képződött bilirubin (nmol/óra/mg fehérje) [118].

6.1.6. A HO-1 és HO-2 expresszió meghatározása bal szívkamrában

Az állatokon cervikális diszlokációt hajtottunk végre, majd a HO-1 és HO-2 enzimek expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk [119, 120]. Az eltávolított bal kamra szöveteket jégen tartott Tris-mannitol puffer (2,0 mM Tris 7-9, 50,0 mM mannitol, 100,0 µM fenil-metil-szulfonil-fluorid, 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 % nátrium dodecyl szulfát (SDS); 10 % ß-merkaptoetanol; 20 % glicerol), majd denaturáltunk (100 ^{o}C-os vízfürdő, 3 perc). A 25 µg fehérjéket tartalmazó mintákat ezt követően 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen megfutattuk (100V/50 mA) és nitrocellulóz memránra (Hybond ECL Nitrocellulose membrán, Amersham, Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK) transzferáltuk át (100 V, 100 mA, 2 óra; Cleaver SD10 Semi dry). A fél órás blokkolást (PBS pH 7,4; 0,25 %-os Tween 20, 5 %-os sovány tejpor) követően egér anti-HO-1 (1/10000) vagy egér anti-HO-2 monoklonális antitestet (1/1000) 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 ^{o}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, Uvisoft Uviprochemi (Iconix, Toronto, Kanada) rendszerrel exponáltuk, ezt követően Quantity One program segítségével értékeltük [118].

6.1.7. Adrenalin és fentolamin által kiváltott experimentális angina modell (ST depresszió)

A kísérleti állatokat uretánnal (30 %, 0,50 ml/100g, i.p.) altattuk, testhőmérsékletüket 37 ^{o}C-on tartottuk. Az EKG vizsgálatához az elektródokat a bőr alá szúrtuk és az alábbi pozícióban helyeztük el: a fekete elektród (földelés)/ jobb láb, piros elektród/ bal láb és lila elektród/ bal mellső láb. Méréseinkhez Einthoven f. III elvezetést alkalmaztunk. A szívizom iszkémia meghatározásához az ST változását használtuk fel. ST szegmens értékként az S hullám csúcsa után 13 ms-mal mért átlagos EKG feszültséget definiáltuk. Kiszámoltuk az anginát kiváltó

ágensek alkalmazása előtti és utáni, ST szegmens amplitúdókban tapasztalt különbségeket, és mV-ban fejeztük ki az ST szegmens depresziójaként. Az adrenalin-fentolamin modellben egyetlen dózisnyi adrenalin (10,0 µg/kg) majd 30 s elteltével α-adrenoceptor antagonista fentolamint (15,0 mg/kg) adtunk az állatok farki vénájába. Az egyes ágenseket 0,20 ml fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. A HO enzimek aktivitását ón- protoporfirin IX-cel gátoltuk le (SnPP: 30 µmol/kg s.c., pH 7,4, 24 és 1 órás előkezelés) [118].

6.1.8. Statisztikai analízis

Az adatok átlag ± S.E.M.-ként fejeztük ki. A statisztikai szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg és az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. A Western blot kísérlet eredményeit reprezentatív képeken mutatjuk be.

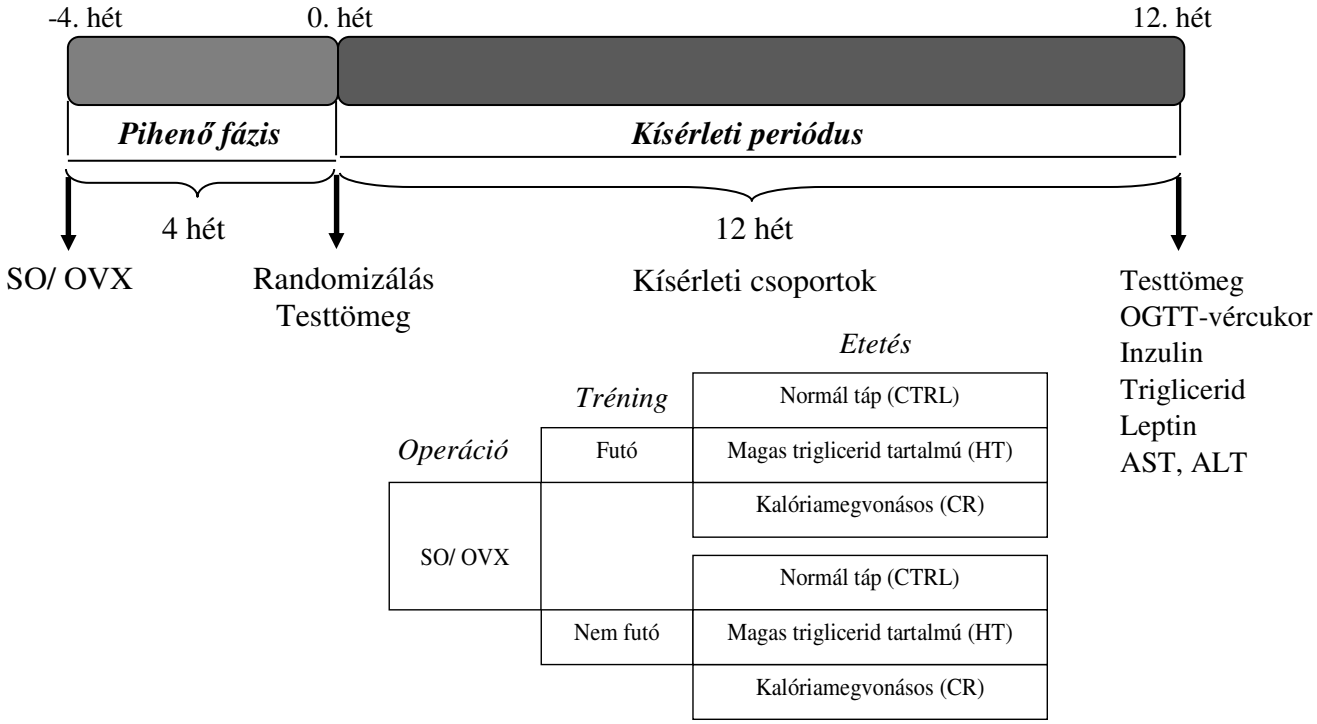
6.2. A kalória megvonás (CR), magas triglicerid tartalmú étrend (HT) és a szabadidős testmozgás hatásának vizsgálata reproduktív korú, illetve ösztrogénhiányos nőstényekben

6.2.1. Vizsgált állatcsoportok

Kísérleteinkhez azonos korú (10 hetes) nőstény Wistar patkányokat (Toxi-Coop Zrt., Magyarország) használtunk. Az állatok egy csoportján áloperálást (SO) hajtottunk végre, az ösztrogénhiányos állapotot pedig bilaterális, sebészeti ovariektómiával (OVX) idéztük elő. Négyhetes pihenő fázist követően az állatokat a tréning és/vagy a diéta jellege alapján további alcsoportokra osztottuk, majd 12 hetes kísérleti periódust követően meghatároztuk a metabolikus paramétereket (8. ábra). A tréning protokollt szabadidős testmozgásmodellként definiáltuk, csökkentve a lehetséges stresszhatásokat, ezzel megkülönböztetve az erőnléti, intenzív fizikai metodikai eljárásoktól. A szabadidős testmozgást végző állatokat futókerékkel felszerelt, mérőórával ellátott ketrecekben (Acéllabor Ltd., Budapest) helyeztük el, ezzel szabad hozzáférést biztosítva a kerékhez a nap 24 órájában, 12 héten keresztül. A kísérleti periódus során az állatok átlagosan 4 km/nap távot tettek meg. A diéta típusa normál mennyiségű tápot (CTRL), magas triglicerid tartalmú étrendet 40 %-os zsírtartalommal (HT), vagy 50 %-os kalóriamegvonásos diétát (CR) jelentett. A CR csoportba tartozó állatok esetén

az 50 %-os kalóriamegvonást előzetes megfigyelések alapján határoztuk meg, mely az állatok átlagos napi fogyasztásának 50 %-os csökkentését jelentette.

Az állatokat standard körülmények között (hőmérséklet, világítás, páratartalom) tartottuk, csapvizet *ad libitum* kaptak és az adott diéta típus alapján meghatározott patkánytápot fogyasztottak. A kísérleteink során felhasznált állatok tartása és felhasználása az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU előírásainak alapján, a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998) és a 40/2013. II. 14. kormányrendeletnek megfelelően történt.



8. ábra: Kísérleti protokoll, valamint az SO és OVX nőstények csoportosítása a tréning és az étrend alapján

6.2.2. A testtömeg meghatározása

Az állatok testtömegét a kísérleti periódus kezdtén (0. hét), illetve a végén (12. hét) egyaránt mértük. Az állatok egyedi testtömeg adatait jegyzőkönyve rögzítettük.

6.2.3. Orális glükóz tolerancia teszt (OGTT)

A patkányok glükózterhelésre adott válaszát OGTT segítségével határoztuk meg a 12 hetes kísérleti periódus befejeztével. A vizsgálat előtti napon az állatoktól 12 órára megvontuk a táplálékot, majd meghatároztuk az éhomi, illetve a 30., 60. és 120 percben 0,1 g/ttkg dózisú cukorterhelésre adott vércukor értékeket (Accu-Chek Active). A laterális farokvénából nyert vért minden állat esetén, valamint minden időpillanatban külön tesztcsíkra cseppentettük. A glükóz dehidrogenáz és a vércukor reakcióját a tesztfelület színváltozása jelzi. A vércukormérő észleli ezt a változást és ebből számítja ki a vércukorértéket mmol/l-ben kifejezve. A vércukorméréssel megegyező időpillanatokban a laterális farokvénából vért vettünk az inzulinszint meghatározásához. A vérmintákat 10 percig, 1000 g, 4 °C- on centrifugáltuk, majd a további felhasználásig -20 °C- on tároltuk.

6.2.4. Az inzulin, leptin, triglicerid, aszpartát aminotranszferáz (AST) és az alanin aminotranszferáz (ALT) koncentrációjának meghatározása

A 12 hetes periódus végén a szérum inzulin (0., 30., 60. és 120. percben), plazma leptin, triglicerid, valamint az AST és ALT enzimek koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg a gyártó cég (SunRed Biological Technology Co., Shanghai) leírása alapján. A mérés során 50 µl standardot, 40 µl mintát 10 µl biotinált ellenanyagot, valamint 50 µl sztreptavidin-HRP-t pipettázunk a plate-re. ELISA plate rázó segítségével, 37 °C-on, 1 órás inkubációt követően a plate 5x került átmosásra a meg nem kötött konjugát eltávolítása érdekében. Ezután a plate-re 50 µl Kromogén A és B oldatot adagoltunk, majd 37 °C-on 10 percig inkubáltuk. Az optikai denzitást ELISA reader (Benchmark Microplate reader; Bio-Rad) segítségével 450 nm-en mértük a STOP oldat hozzáadása utáni 30 percen belül. Az inzulin értékeket mIU/l-ben, a leptin értékeket ng/l-ben, a triglicerid szintet mmol/l-ben, az AST és ALT enzimek koncentrációját U/l-ben fejeztük ki.

6.2.5. Statisztikai analízis

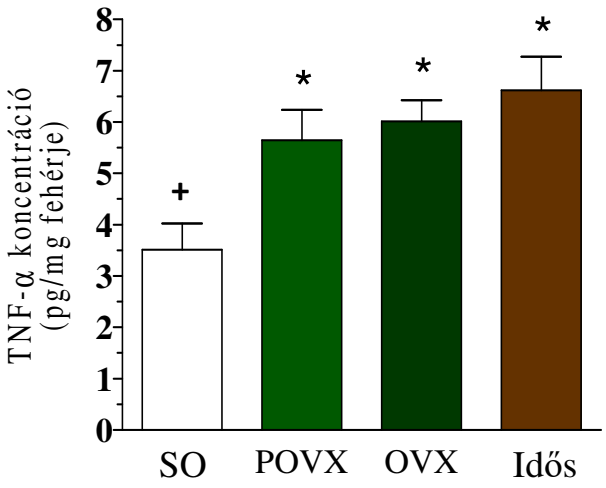
Az adatok átlag ± S.E.M.-ként fejeztük ki. A statisztikai szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg és az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

7. Eredmények

7.1. A természetes és kísérletes menopauza hatásainak vizsgálata

7.1.1. A TNF-α és IL-6 koncentrációja bal szívkamrában

A TNF-α (9. ábra) és IL-6 (10. ábra) gyulladáskeltő citokinek koncentrációja idős nőstényeknél és kísérletes menopauzát (POVX, OVX) követően szignifikánsan emelkedett az SO csoporthoz képest. Az IL-6 koncentráció tekintetében további szignifikáns növekedést tapasztaltunk az idős nőstények bal szívkamrájában az OVX állatokhoz viszonyítva.

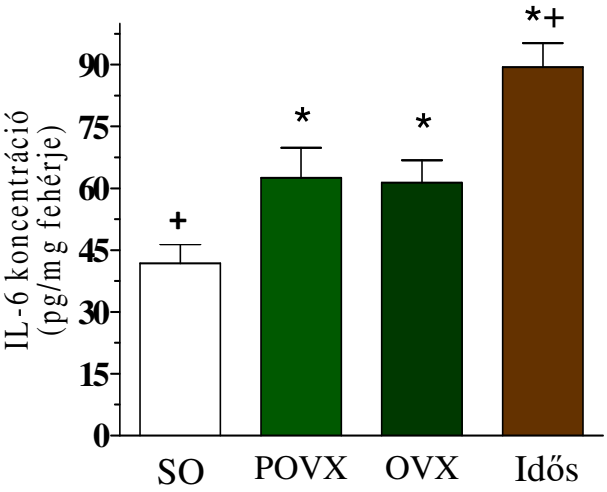


9. ábra: TNF-α koncentrációja SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

Az eredményeket pg/mg fehérjeként fejeztük ki és átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg, n= 6-8

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX csoporthoz viszonyítva



10. ábra: IL-6 koncentrációja SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

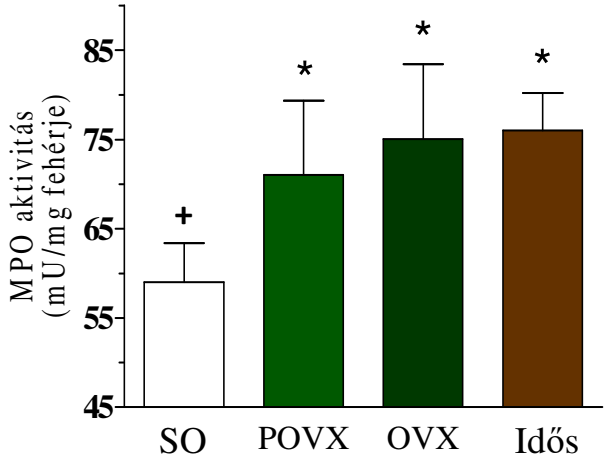
Az eredményeket pg/mg fehérjeként fejeztük ki és átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg, n= 8-9

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX csoporthoz viszonyítva

7.1.2. A MPO enzim aktivitása bal szívkamrában

A MPO enzim aktivitását spektrofotometriásan, az oxidált *o*-dianizidin mennyiségéből határoztuk meg. Ösztrogénhiányt követően, az idős, POVX és OVX csoportokban szignifikánsan emelkedett a MPO enzim aktivitása az SO értékekhez viszonyítva (11. ábra).



11. ábra: A MPO enzim aktivitása SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

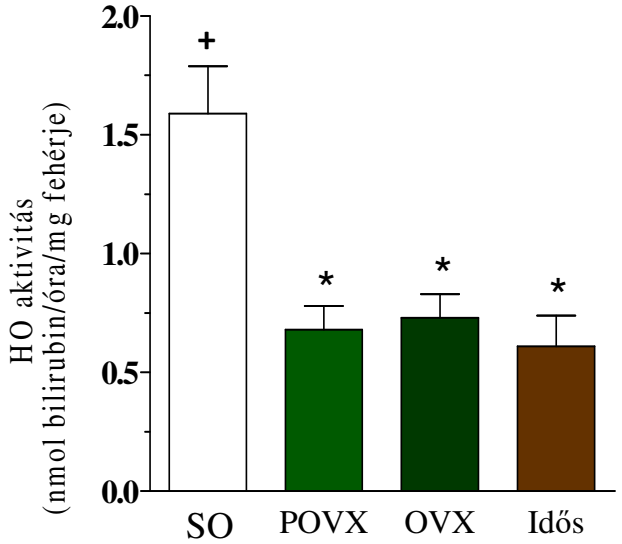
Az eredményeket mU/mg fehérjeként fejeztük ki és átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg, n= 7-8

*p<0,05: Szignifikáns különbség su SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX csoporthoz viszonyítva

7.1.3. A HO enzim aktivitása bal szívkamrában

A HO aktivitásra a képződött bilirubin mennyiségből következtettünk. Eredményeink jól mutatják, hogy ösztrogénhiányos állapotokban (POVX, OVX, idős) szignifikánsan csökkent az enzim aktivitása (12. ábra).



12. ábra: A HO enzimek aktivitása SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

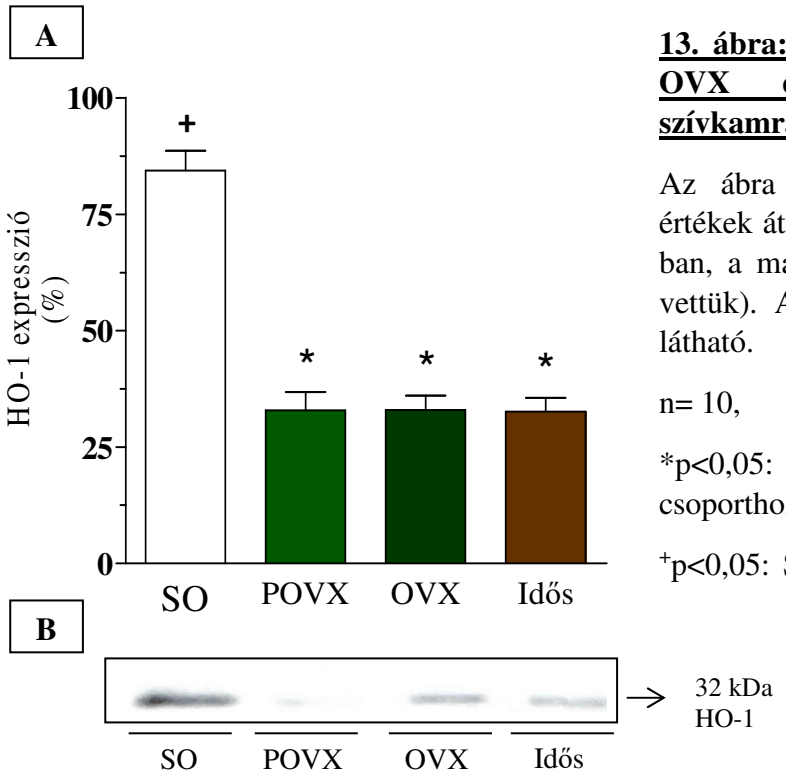
Az eredményeket nmol bilirubin/óra/mg fehérjeként fejeztük ki és átlag ± S.E.M.-ben adtuk meg, n= 11-12

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX csoporthoz viszonyítva

7.1.4. A HO-1 és HO-2 izoformák expressziója bal szívkamrában

A HO-1 és HO-2 szöveti fehérjék expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk. A kapott eredmények megerősítették a HO aktivitás esetében tapasztaltakat, ugyanis ösztrogénhiány következtében a HO aktivitáshoz hasonlóan szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a HO-1 (13. ábra) és HO-2 (14. ábra) izoformák expressziójában idős, POVX és OVX nőstények bal szívkamrájában.



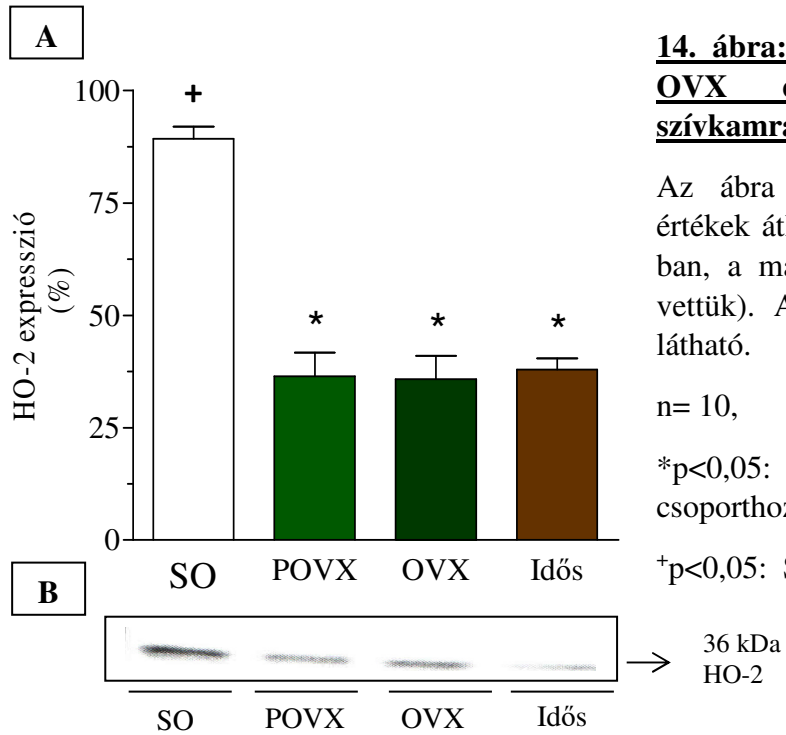
13. ábra: HO-1 expresszió SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értékek átlagát mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, a maximális expressziót 100 %-nak vettük). A „B” részen reprezentatív kép látható.

n= 10,

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX



14. ábra: HO-2 expresszió SO, POVX, OVX és idős patkányok bal szívkamrájában

Az ábra „A” része a denzitometrikus értékek átlagát mutatja (átlag ± S.E.M. %-ban, a maximális expressziót 100 %-nak vettük). A „B” részen reprezentatív kép látható.

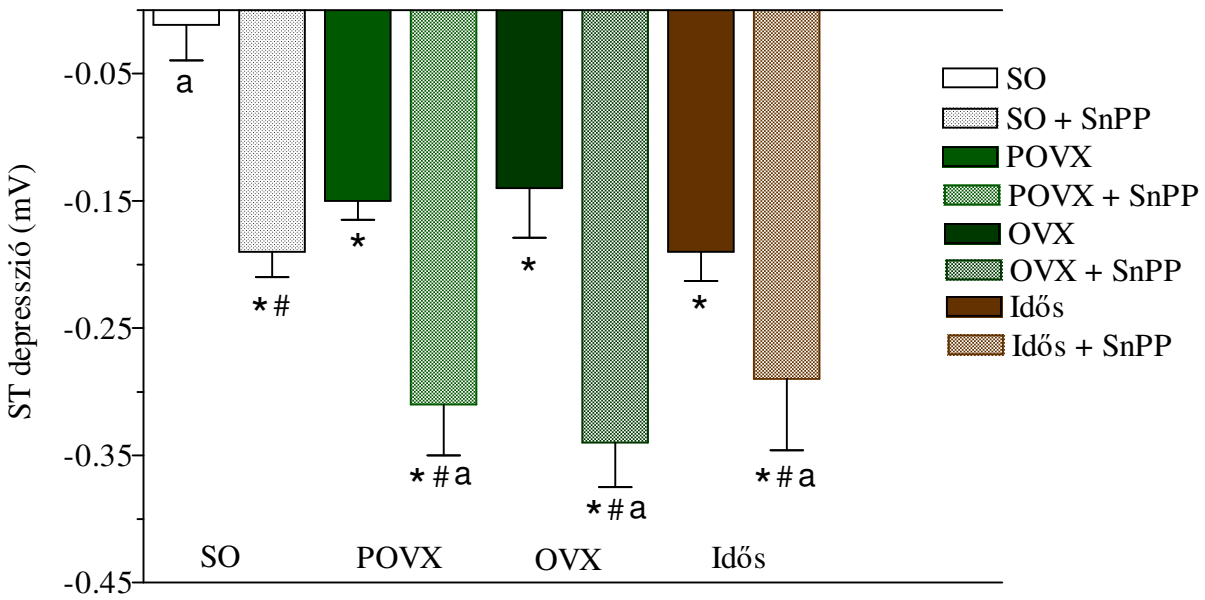
n= 10,

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

$^{+}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX

7.1.5. A HO enzim aktivitás- gátlás hatása a szívizom iszkémiára adrenalin+ fentolamin modellben (ST depresszió)

Intravénás adrenalin (10,0 µg/kg), majd 30 s elteltével fentolamin (15,0 mg/kg) kezelést követően az ST szegmens változásait standard felszíni ECG II-vel vizsgáltuk. Természetes menopauzát követően idős intakt nőstényeknél, valamint a POVX és OVX csoportokban súlyosbodott az ST depresszió mértéke a kontroll csoporthoz viszonyítva. SnPP előkezelést követően SO nőstényeknél kialakult az ST depresszió, míg ösztrogénhiányos állapotban (POVX és OVX) tovább fokozódott a szívizom iszkémiára való hajlam a kezeletlen csoportokhoz viszonyítva. További szignifikáns különbségeket tapasztaltunk az ösztrogénhiányos (POVX és OVX) SnPP-kezelt, valamint SnPP-kezelt SO nőstények ST depressziója között (15. ábra).



15. ábra: HO enzim aktivitás inhibítor SnPP hatása az ST szegmens változásaira adrenalin + fentolamin modellben

Az eredmények mV-ban értendők és átlag ± S.E.M.-ként vannak megadva, n= 11-13

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO csoporthoz viszonyítva

#p<0,05: Szignifikáns különbség az azonos csoporton belüli SnPP-vel kezelt és kezeletlen állatok között

ap<0,05: Szignifikáns különbség az SnPP-kezelt SO nőstényekhez viszonyítva

7.2. A kalóriamegvonás (CR), magas triglicerid tartalmú étrend (HT) és a szabadidős testmozgás hatásának vizsgálata reproduktív korú, illetve ösztrogénhiányos (OVX) nőstényekben

7.2.1. A testtömeg változása a 12 hetes kísérleti periódus kezdetén és végén SO és OVX nőstényekben

Az állatok testtömegének változásait, az áloperációt (SO) és ovariektómiát (OVX) követő 12 hetes kísérleti periódus során vizsgáltuk. Az 1. táblázatban az etetési és tréning periódus kezdetén és végén mért testtömeg adatokat tüntettük fel. Az ösztrogénhiány kialakulásával, a kísérleti periódus kezdetén (0. hét), az OVX nőstényeknél testtömeg-gyarapodást tapasztaltunk az SO csoporthoz képest. A 12. héten mért értékek jól mutatják, hogy a CR önmagában is csökkenti a testtömeget, azonban a CR és a testmozgás együttes hatása bizonyul a leghatékonyabb módszernek a testtömeg-kontroll tekintetében. Az OVX csoportban a CR és a szabadidős tréning 17 %-os testtömeg csökkenést eredményezett. A HT és normál tápon tartott állatoknál a futás nem csökkentette a testtömeget.

Csoportok	A kísérleti periódus kezdetén (0. hét) mért testtömeg (g)	A kísérleti periódus végén (12. hét) mért testtömeg (g)
SO CTRL	279 ± 5,5	354 ± 9,2
SO CTRL futó	273 ± 9,9	331 ± 9,0
SO CR	283 ± 7,6	263 ± 5,3$^{*\&}$
SO CR futó	261 ± 6,1$^{*\#\&}$	234 ± 12,4$^{*\#\&}$
SO HT	282 ± 11,0	319 ± 11,3*
SO HT R	269 ± 6,1$^{\&}$	325 ± 7,8*
OVX CTRL	300 ± 7,2*	349 ± 21,9
OVX CTRL futó	321 ± 9,4*	378 ± 14,2$^{\&}$
OVX CR	334 ± 10,1$^{*\&}$	305 ± 9,3$^{*\&}$
OVX CR futó	312 ± 9,3*	253 ± 25,7$^{*\&}$
OVX HT	309 ± 6,7*	377 ± 12,0$^{\&}$
OVX HT futó	326 ± 7,5$^{*\&}$	393 ± 13.7$^{*\&}$

1. táblázat: A testtömeg változása a 12 hetes kísérleti periódus kezdetén és végén

A testtömeg értékek g-ban értendők és átlag ± S.E.M.-ként vannak megadva, n= 10-12

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva a kísérleti periódus azonos időpontjában

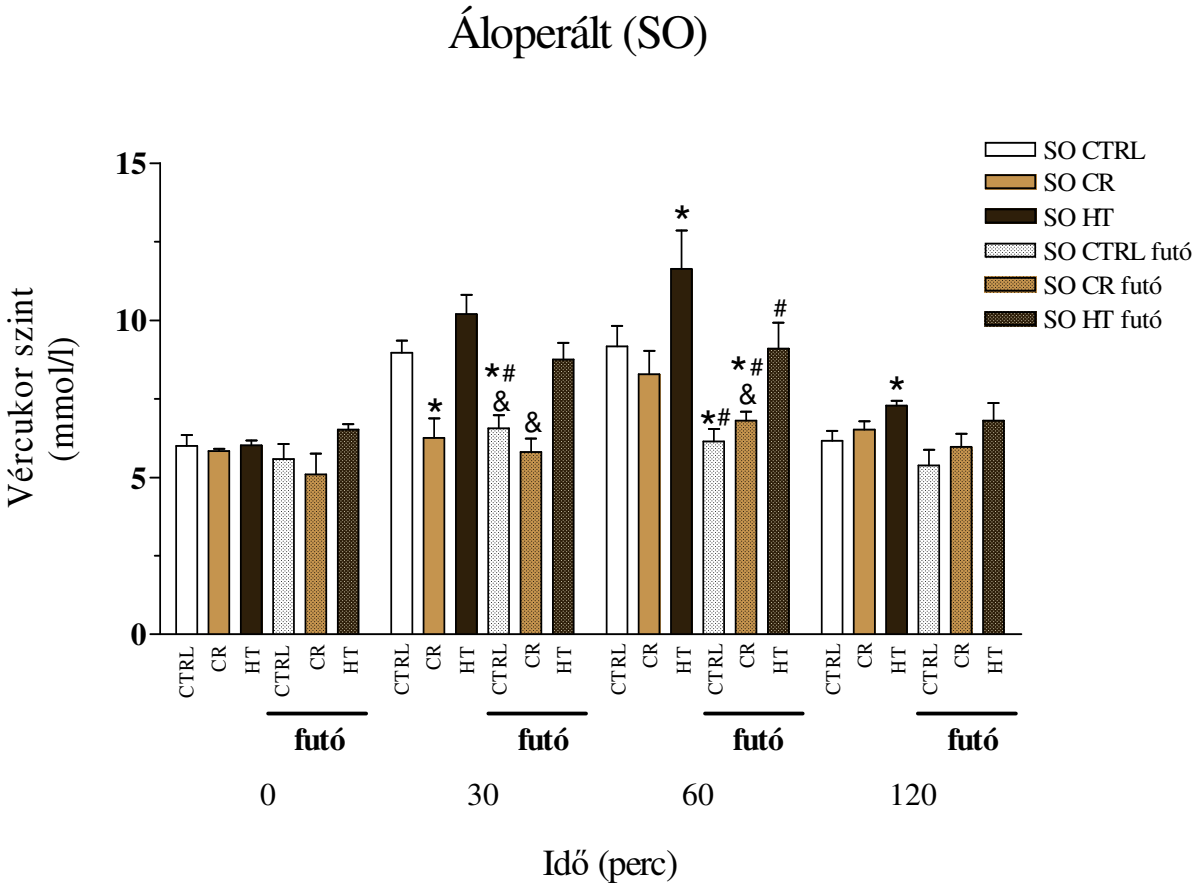
$^{\#}$p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül a futó és nem futó állatok között a kísérleti periódus azonos időpontjában

$^{\&}$p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva a kísérleti periódus azonos időpontjában

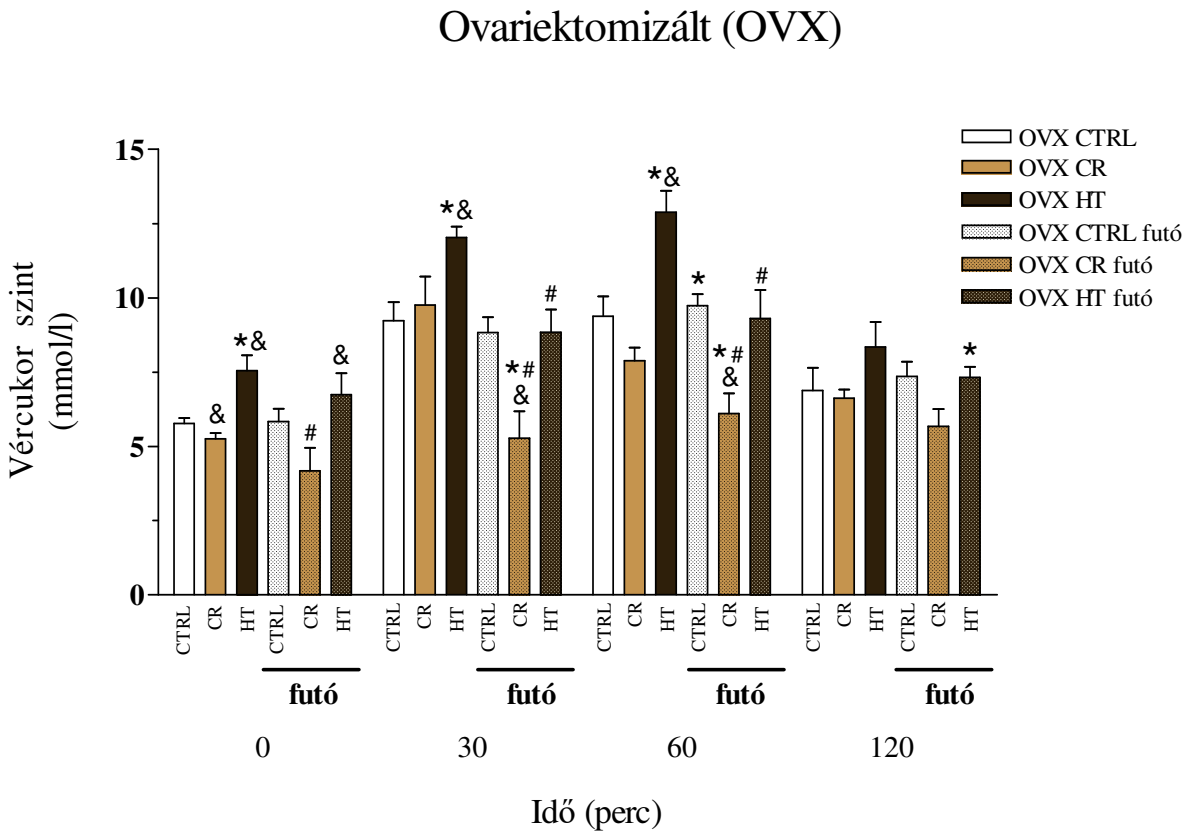
7.2.2. A vércukorszint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben

Tizenkéthetes kísérleti periódust követően meghatároztuk az SO és OVX állatok éhomi és glükózterhelésre adott vércukor értékeit. Az SO nőstények éhomi (0. perc) vércukor szintje a CTRL, HT és CR diéta során hasonló értéket mutatott, míg az OVX HT csoportba tartozó állatok esetén szignifikáns növekedést tapasztaltunk az SO CTRL csoport 0. percben mért értékeihez viszonyítva. A glükóz tolerancia vizsgálatára az állatokat 0,1 g/ttkg dózisú cukoroldattal kezeltük, majd meghatároztuk a 30., 60. és 120. percben mért vércukor értékeket. A zsírdús étrend (HT) hatására SO nőstényeknél a 30., 60. és 120. percben egyaránt vércukorszint emelkedést tapasztaltunk az SO CTRL csoporthoz viszonyítva. OVX nőstényeknél a 120. percben mért adatok kivételével a zsírdús étkezés (HT) szignifikáns növekedést eredményezett az adott időpillanat SO CTRL és OVX CTRL csoportok értékeihez viszonyítva. Az 50 %-os CR diéta önmagában kizárólag a 30. percben okozott szignifikáns csökkenést az adott SO CTRL állatok vércukor értékeihez képest. A 12 hetes testmozgás önmagában is javulást eredményezett a 30. percben mért SO CTRL futó, és OVX HT futó csoportoknál, valamint a 60. percben mért SO HT futó és OVX HT futó állatoknál. A 12 hetes tréning és CR együttes hatásának vizsgálatakor a 60. percben mért SO CR futó, továbbá a 0., 30., és 60. percben mutatott OVX CR futó csoportok esetén tapasztaltunk szignifikáns javulást a vércukor értékekben. Az éhomi és glükózterhelésre adott vércukorszint változást a 16. A és B ábra mutatja be részletesen.

A


Áloperált (SO)
SO CTRL
SO CR
SO HT
SO CTRL futó
SO CR futó
SO HT futó
Vércukor szint (mmol/l)
15
10
5
0
CTRL
CR
HT
futó
0
30
60
120
Idő (perc)

B



16. A és B ábra: Az éhomi és glükózterhelésre adott vércukorszint változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben

Az ábra „A" része az áloperált (SO), „B" része az ovariektomizált (OVX) nőstények vércukor értékeit mutatja (átlag ± S.E.M., mmol/l- ben kifejezve), n= 10-12

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva a 0., 30., 60. és 120. percben

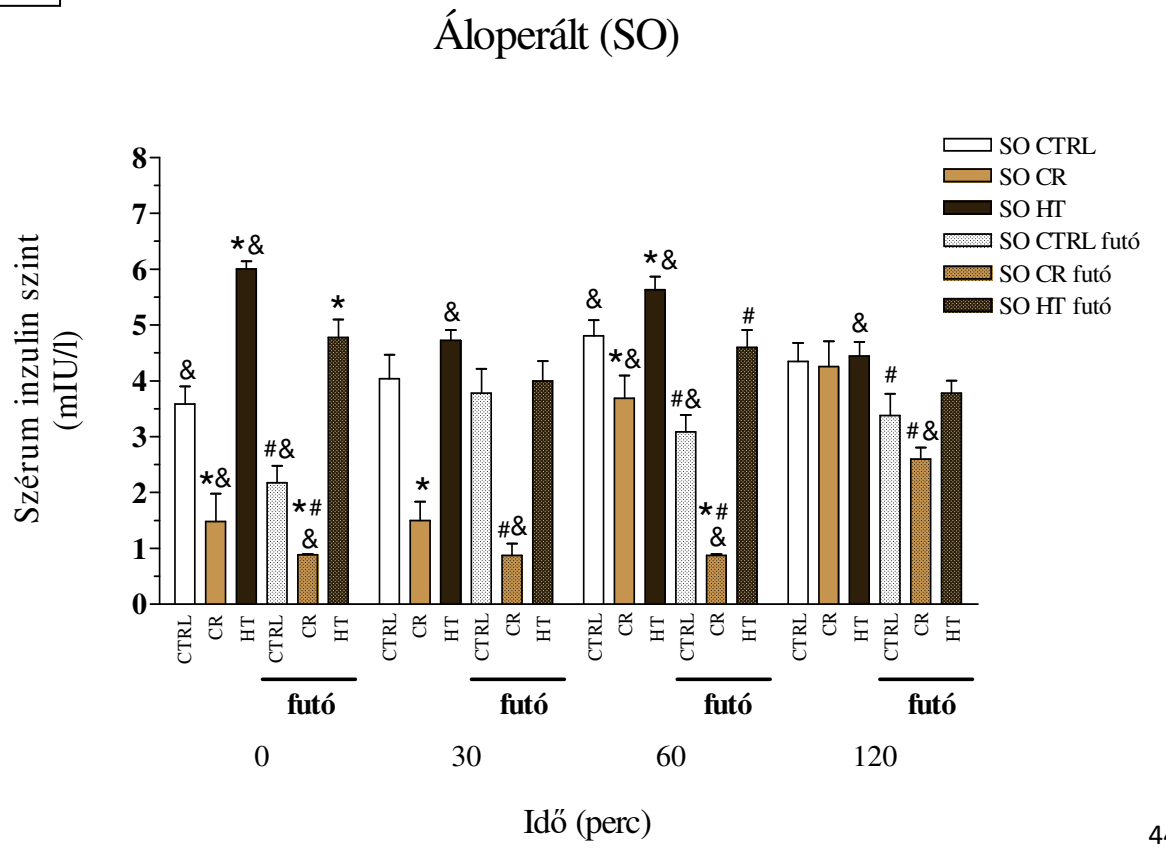
#p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül a futó és nem futó állatok között a 0., 30., 60. és 120. percben

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva a 0., 30., 60. és 120. percben

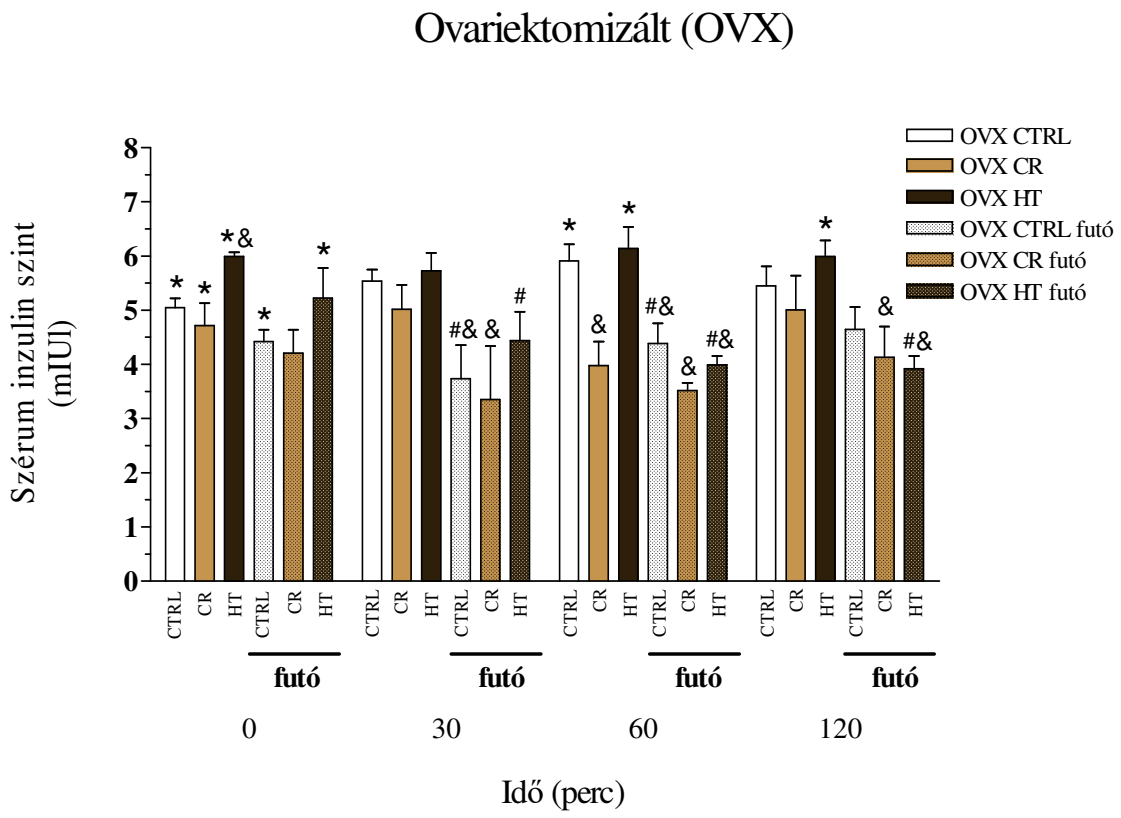
7.2.3. A szérum inzulin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben

A szérum inzulin szintet a 12 hetes kísérleti periódus végén, a vércukor értékek meghatározásnál is figyelembe vett időpillanatokban (0., 30., 60. és 120. perc), laterális farokvénából határoztuk meg. Az SO nőstények éhomi (0. perc) inzulin értékei szignifikánsan csökkenést mutatnak a CR hatására, míg a zsírdús étrend (HT) jelentős emelkedést eredményezett. A CR diéta által kiváltott inzulin csökkenés, valamint a HT étrend inzulinszintet növelő hatása a 30. és 60. percben is megfigyelhető volt az SO nőstényeknél. OVX következtében szignifikáns növekedést tapasztaltunk az éhomi inzulin értékek tekintetében minden diéta típus esetén az SO CTRL értékekhez képest. Míg SO nőstényeknél a 12 hetes CR és a futókerekes testmozgás kombinált hatása az inzulin értékek szignifikáns csökkenését eredményezte, OVX nőstényeknél ez a pozitív hatás elmaradt. OVX HT állatoknál a testmozgás önmagában szignifikánsan csökkentette a 60. és 120. percben mért inzulinszintet a nem futó állatok értékeihez képest, továbbá az adott OVX CTRL csoportokhoz viszonyítva. Az éhomi és glükózterhelésre adott inzulinszint változását a 17. A és B ábra összegzi.

A



B



<u>17. A és B ábra: Az éhomi és glükózterhelésre adott inzulin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben</u>

Az ábra „A” része az áloperált, „B” része az ovariektomizált nőstények inzulin értékeit mutatja (átlag ± S.E.M., mIU/l- ben kifejezve), n= 10

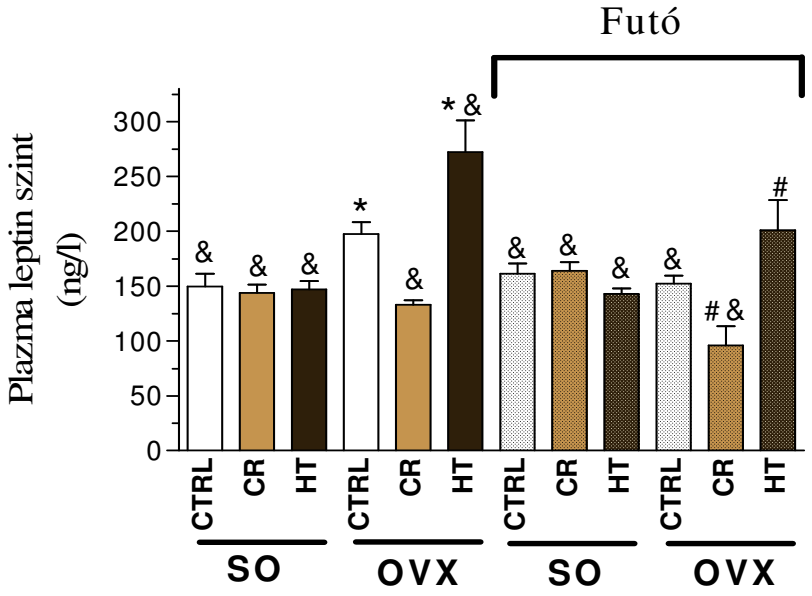
*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva a 0., 30., 60. és 120. percben

#p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül a futó és nem futó állatok között a 0., 30., 60. és 120. percben

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva a 0., 30., 60. és 120. percben

7.2.4. A plazma leptin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben

A 18. ábrán jól látható, hogy az ösztrogénhiányos, illetve a HT étrenden tartott állatok plazma leptin értékei mutatják a legmagasabb értékeket, azonban ezt a megnövekedett leptin koncentrációt 12 hetes tréning protokollunk szignifikánsan csökkentette.



18. ábra: A leptin szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben

Az eredményeket ng/l-ben fejeztük ki és átlag ± S.E.M.- ben adtuk meg, n= 10

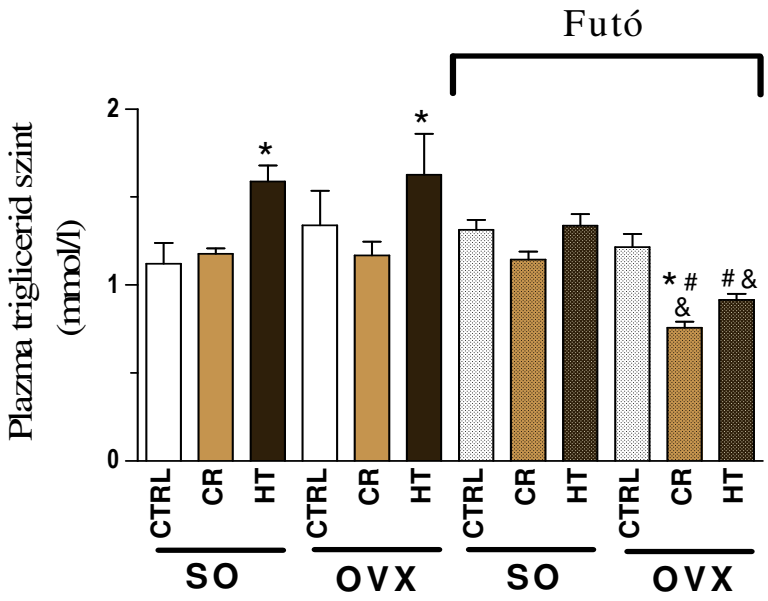
*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva

#p<0,05: Szignifikáns különbség az egy csoporton belüli futó és nem futó állatok között

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva

7.2.5. A plazma triglicerid szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben

Eredményeink jól mutatják, hogy zsírdús etetés (HT) hatására szignifikánsan emelkedett a plazma triglicerid koncentrációja az SO CTRL értékekhez viszonyítva. Az OVX CR és az OVX HT csoportokban a 12 hetes futókerekes testmozgás csökkentette a plazma triglicerid szintjét.



19. ábra: A triglicerid szint változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben

Az eredményeket mmol/l-ben fejeztük ki és átlag ± S.E.M.- ben adtuk meg, n= 12

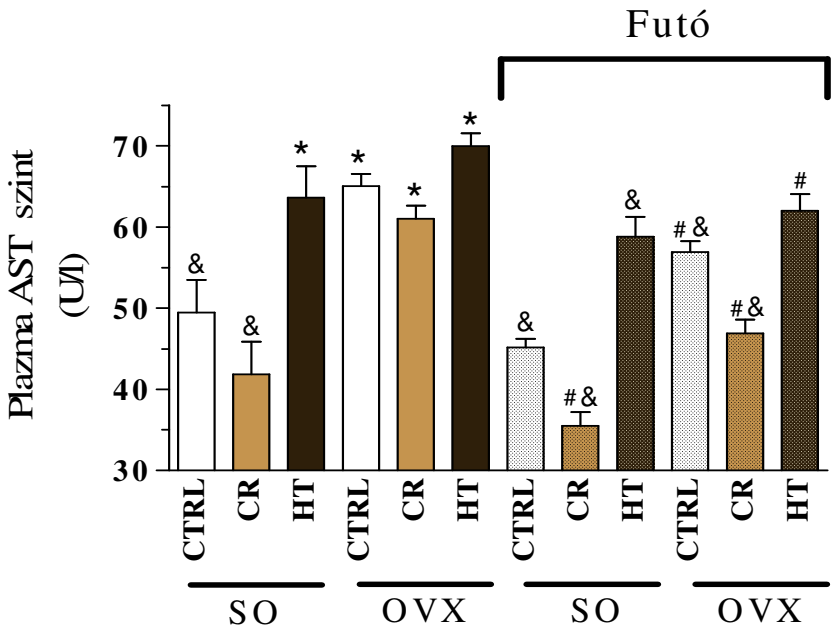
*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva

#p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül futó és nem futó állatok között

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva

7.2.6. A plazma AST és ALT enzimek koncentrációja 12 hetes kísérleti periódust követően SO és OVX nőstényekben

Az AST és az ALT a májat érintő sérülések laboratóriumi indikátorai, melyek a sérülést követően jutnak a keringésbe. Ösztrogénhiányos állapotban (OVX) és zsírdús étkezés (HT) hatására szignifikáns növekedést tapasztaltunk a plazma AST koncentrációjában. A 12 hetes futókerekes tréning protokollunk csökkentette az emelkedett AST értékeket, mely CR diétával kombinálva bizonyult a legeredményesebbnek (20. ábra). ALT koncentráció- növekedést az OVX CTRL és OVX HT csoportokban igazoltunk. A 12 hetes testmozgás pozitívan befolyásolta a zsírdús étkezés (HT) eredményeként megnövekedett értékeket (21. ábra).



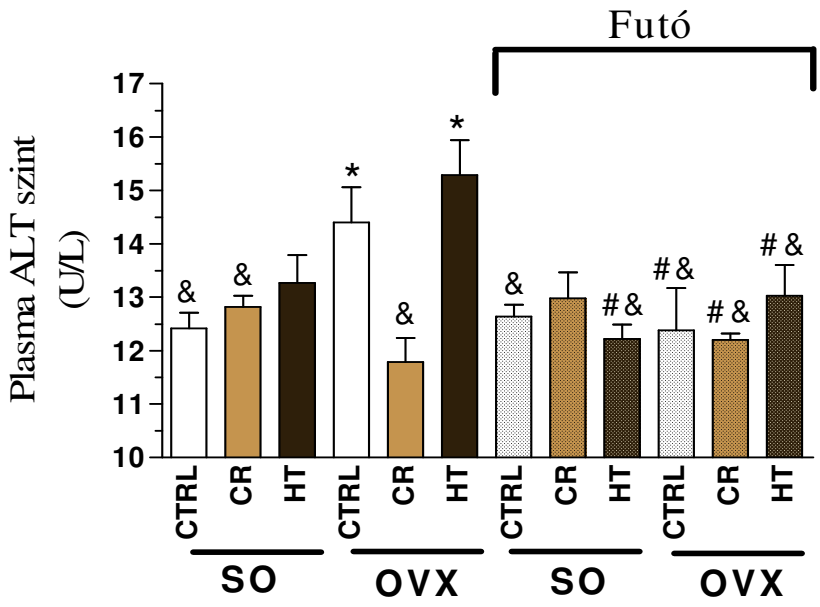
20. ábra: Az AST koncentráció változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben

Az eredményeket U/l-ben fejeztük ki és átlag ± S.E.M.- ben adtuk meg, n= 11

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva

#p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül a futó és nem futó állatok között

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva



21. ábra: Az ALT koncentráció változása 12 hetes kísérleti periódust követően áloperált és ovariektomizált nőstényekben

Az eredményeket U/l-ben fejeztük ki és átlag ± S.E.M.- ben adtuk meg, n= 11

*p<0,05: Szignifikáns különbség az SO CTRL csoporthoz viszonyítva

#p<0,05: Szignifikáns különbség egy csoporton belül a futó és nem futó állatok között

&p<0,05: Szignifikáns különbség az OVX CTRL csoporthoz viszonyítva

8. Diszkusszió

Eredményeink összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, miszerint szoros összefüggés vonható az ösztrogénhiány, az életkor és a metabolikus- valamint a CVD incidenciája között. Az ösztrogénhiánnyal és a szervezet öregedési folyamatival járó pathológiás elváltozások megismerése nélkülözhetetlen a megfelelő terápiás lehetőségek kiválasztása szempontjából. A természetes és mesterséges menopauzát követő szexuálszteroid hiányállapot eredményeként az egész szervezetet érintő gyulladásos folyamatok jelennek meg. Reproduktív korban az ösztrogén a gyulladásos transzkripciós faktorok gátlásával csökkenti a gyulladásos folyamatok kialakulását, viszont menopauzában bekövetkező hormonális változások eredményeként a NF-κB és az AP-1 szignalizációs útvonalak stimulációja révén fokozódik a gyulladásos citokinek- és a gyulladásos receptorok expressziója (IL-6, IL-1, IL-8, TNF-α) [58, 121]. Kísérleteink során az OVX és POVX állatokban, valamint természetes menopauzát követően szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az IL-6 és TNF-α gyulladáskeltő citokinek koncentrációjában az áloperált csoporthoz képest. Az öregedési folyamat során a NF-κB IL-6 génhez való kötődésével gyulladásos folyamatok jelennek meg, melyet az oxigén szabadgyökök fokozott termelődése előzi meg [122, 123]. Ösztrogénhiányos állapotokban a gyulladásos citokinek emelkedett koncentrációjához hasonlóan szignifikáns növekedést tapasztaltunk a MPO enzim aktivitásában is. A MPO egy hem tartalmú enzim, mely elsősorban a neutrofil granulociták azurofil granulumaiban található, de kimutatható eosinofil granulocitákban és monocitákban is. A MPO által katalizált reakció során a hidrogén-peroxid és klorid ion hipoklórossavvá alakul, mely a gyulladásos körülmények között szekretálódik [124]. Számos tanulmány igazolja a MPO aktivitás/tartalom és az iszkémiás szívbetegség közötti szoros összefüggést [125-127]. A gyulladásos folyamatok során felborul az oxidatív ágensek és az antioxidáns molekulák közötti egyensúly, így a felszaporodó hidrogén-peroxid és a keletkező MPO szerepet játszik a kardiovaszkuláris rendszert érintő patológiás folyamatok kialakulásában. A MPO aktivitás a neutrofil granulociták infiltrációjával arányos gyulladásos-, és egyben elfogadott, újszerű kardiovaszkuláris biomarker is. A MPO az LDL-koleszterinhez kötődve serkenti a habos sejtek kialakulását, mely hozzájárul az atheroszklerotikus plakk-képződéshez. A MPO-katalizált oxidáció eredményeként a fiziológiai körülmények között kardioprotektív hatású HDL-koleszterin diszfunkciója is megfigyelhető [128]. Klinikai vizsgálatok igazolják, hogy a MPO enzim a mátrix metalloproteázok aktiválásával, illetve a mátrix metalloproteáz szöveti inhibítorok

deaktiválásával gyengítik a plakk fibrózus sapkáját, így növelik a plakkruptúra veszélyét [129, 130]. A MPO-katalizált reakció során az endothelialis NO biológiai hasznosulásának csökkenése károsítja a NO vazodilatív hatását [131]. A MPO szint összefüggésbe hozható az ST-szegmens változásaival, így a kardiovaszkuláris kórképek prediktív markerének bizonyul [132, 133].

A szív-és érrendszeri megbetegedések gyakorisága, illetve az általuk okozott halálozás magasabb férfiaknál, mint premenopauzában levő nők esetében, azonban a posztmenopauzát jellemző ösztrogénhiányos állapot fokozza a kardiovaszkuláris rizikót. Korábbi kísérleteink során a nemek közötti különbséget vizsgáltuk a kardiovaszkuláris rizikó tekintetében. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy fertilis korú nőstény patkányokban az ösztrogén, a HO aktiváció- és a HO-1/HO-2 expresszió serkentésén keresztül részt vesz a szív és érrendszer védelmében [118]. A HO- katalizált reakció során felszabaduló biliverdin, bilirubin és CO gyulladáscsökkentő-, antiapoptotikus-, immunmodulátor- és vazodilatátor funkciójuk révén, valamint az antioxidáns/oxidáns homeosztázis fenntartásával protektív hatással bírnak a kardiovaszkuláris rendszerben [4, 134]. Wang és mtsai. a HO-1 szerepét vizsgálták a szívelégtelenség pathológiás folyamataiban és igazolták, hogy a HO-1 up-reguláció a szívfunkció javítása mellett CO- függő útvonalon keresztül védi a miociták mitokondriumainak membránstabilitását és funkcióját, ezáltal citoprotektív hatást fejt ki az apoptózissal szemben [135]. Yet és mtsai. bizonyították, hogy a HO-1 expresszió védi a szívet az I/R sérüléssel szemben [38]. A HO-1 kardioprotekcióban betöltött szerepe széleskörű, azonban a homeosztázis megváltozása kedvezőtlenül befolyásolhatja a sejtek működését. Az öregedés során krónikus gyulladásos változások mennek végbe a szervezetben, emelkedik a keringő és szöveti gyulladásos markerek jelenléte, melyek fokozzák a kardiovaszkuláris rizikót [136]. Ross és Howlett *in vitro* vizsgálataik során megállapították, hogy a fiatal nőstény patkányokból nyert kamrai miociták sokkal ellenállóbbak az I/R sérüléssel szemben, mint az a hím egyedekből nyert sejtek esetében volt tapasztalható, azonban az ellenálló képesség az öregedéssel vagy OVX következtében csökkent [137]. Ösztrogénhiány következtében csökken a szívben és aortában mért HO enzim aktivitása, mely csökkenti az aorta kontrakciót és szívperfúziót [98]. Vizsgálataink során OVX, POVX és idős nőstényekben egyaránt csökkent a szívben mért HO enzim aktivitás, illetve a HO-1, HO-2 izoformák expressziója. A HO enzim aktivitását gátló SnPP előkezelést alkalmazva áloperált kontroll nőstényeknél kialakult az ST depresszió, ösztrogénhiányos állatoknál pedig tovább súlyosbodott a szívizom iszkémiára való hajlama. A HO enzimek csökkent aktivitásának

eredményeként mérséklődik a hem katabolizmus során felszabaduló biliverdin/bilirubin, valamint a CO végtermék gyulladáscsökkentő és antioxidánsa hatása, így a szervezetet érintő gyulladásos folyamatok jelennek meg. Míg fiziológiás körülmények között a bilirubin gátolja az LDL oxidációs folyamatokat, illetve mérsékli a szabadgyökök okozta oxidatív stressz kialakulását, a bilirubin szint csökkenése súlyosbítja a szív és érrendszert érintő kórfolyamatokat [138].

Posztmenopauzában levő nőknél a kardiovaszkuláris rizikó és a gyulladásos megbetegedésekre való hajlam közvetlen összefüggésbe hozható az ösztrogén hatásainak megszűnésével, azonban a helytelen életmód következtében megjelenő rizikófaktorok a lipid- és szénhidrát háztartásra kifejtett negatív hatásaival tovább fokozzák a metabolikus kórképek kialakulását. Az ösztrogénhiányos posztmenopauzális állapot viszcerális típusú elhízással jellemezhető, melynek mértéke a helytelen életmód (testmozgás hiánya és energiadús táplálkozás) következtében emelkedhet [139, 140]. A hasüregben felhalmozódó viszcerális zsír a belső szervekre (máj, szív, hasnyálmirigy, vázizom) rakódva károsítja azok működését, valamint további kóros elváltozásokat okozva fokozzák a metabolikus szindróma kialakulását. Túlzott energia-bevitelt követően a zsírsejtek hipertrófiája figyelhető meg, mely a zsírsejtek funkcióbeli károsodását eredményezi. A zsírsejtek rezisztenssé válnak az inzulin antilipolitikus hatására, melynek következtében a sejtekből kiáramló megnövekedett FFA szint kapcsolatba hozható az inzulinrezisztenciával és a gyulladásos kaszkádfolyamatok kialakulásával [13]. A FFA gátolja a sejtek glükózfelvételét, illetve a glikogén szintézist, a glikogén raktárak lebontását azonban serkenti, mely a keringésben levő glükóz szint emelkedését eredményezi. Az energiadús táplálkozás, illetve obezitás következtében makrofágok infiltrálódnak a zsírszövetbe, melynek eredményeként fokozódik a zsírszövet citokin és leptin termelése, valamint csökken az adiponektin szint, így annak gyulladáscsökkentő és inzulin-érzékenyítő hatása is [141].

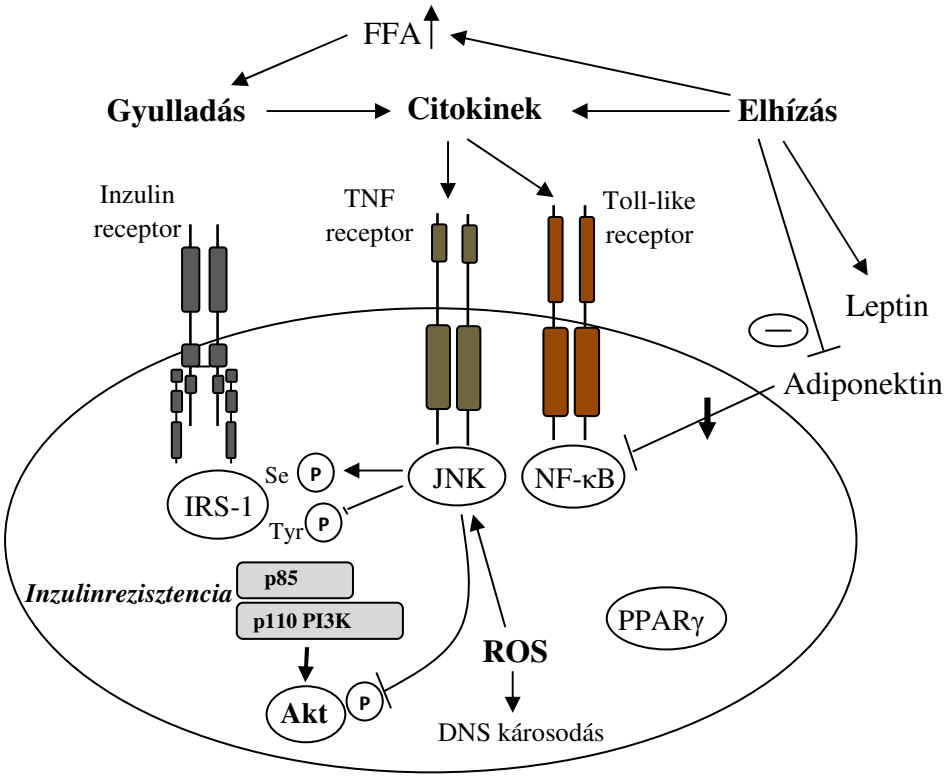
A viszcerális elhízás perzisztáló gyulladásos folyamatokkal, az inzulin érzékenység csökkenésével, valamint a glükóz- háztartás zavarával jellemezhető kórállapot, mely szerepet játszik a CVD és egyéb társbetegségek kialakulásához posztmenopauzában levő, elhízott nőknél [142, 143]. Mai tudásunk szerint az elhízás és az ezt kísérő kóros elváltozások együttes kezelésére nincs univerzális gyógyszer. A pathológiás elváltozások megjelenésének késleltetése, valamint manifesztációjuk csökkentése megvalósulhat a helyes életmód megválasztásával [144]. Számos állatkísérletes tanulmány vizsgálja a testmozgás

metabolizmusra kifejtett hatását, azonban az egyes tréning protokollok eltérőek lehetnek eltérő eredményekkel. Az alkalmazott tréning típusa lehet szabadidős vagy erőnléti mozgástípus, továbbá különbségek lehetnek a testmozgás intenzitásában és időtartamában is. Állatkísérletes munkákban az obezitás, illetve a metabolikus kórképek mérséklésére a futópados vagy a futókerekes tréning protokollokat preferálják. Kísérletünkben futókerekes tréningtípust alkalmaztunk, mely során az állatok a nap 24 órájában szabadon hozzáférhettek a futókerékhez az általuk meghatározott napszakban, intenzitással és időtartamig. A szabadidős futókerekes testmozgás mérsékli a stressz-szintet, valamint nem vezet a szívben a katekolamin szint növekedéséhez [145]. Az ösztrogénhiányos állapot kedvezőtlen hatásainak csökkentésére a futókerekes testmozgás mellett 50 %-os CR-t is alkalmaztunk. A CR hatásai széleskörűek, melyet Trepanowski és mtsai. összefoglaló munkájuk során elemeztek. A CR csökkenti a triglicerid-, a totál- és LDL koleszterin szinteket, mérsékli a TNF-α, IL-6, C-reaktív protein és NF-κB gyulladásos markerek jelenlétét, továbbá javítja a glükózregulációt és inzulin érzékenységet, mely folyamatok révén csökken a kardiovaszkuláris és neurodegeneratív betegségekre való hajlam, valamint a daganatos megbetegedések kialakulásának kockázata [146].

A klinikai és kísérletes megfigyelésekkel összhangban, az ösztrogénhiány, illetve zsírdús táplálkozás eredményeként növekedett a patkányok testtömege. A 12 hetes kísérleti periódust követően mért adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a CR önmagában is hatásos, azonban a CR és testmozgás együttes alkalmazása bizonyul a leghatékonyabb módszernek a testtömeg-kontroll tekintetében. Az ösztrogénhiányos és/ vagy HT étrenden tartott állatoknál (SO HT, OVX CTRL és OVX HT csoportokban) a 12 hetes testmozgás önmagában nem csökkentette a testtömeg értékeket. Eredményeinkhez hasonlóan, Damirchi és mtsai. testmozgást végző, OVX patkányoknál emelkedett táplálékbevitelt és testtömeg növekedést igazoltak. Munkájuk során a viszcerális zsírmennyiség változásait is követték és megállapították, hogy az OVX következtében megemelkedett viszcerális zsírmennyiséget a 8 hetes testmozgás szignifikánsan csökkentette [147]. Noha a testtömeg-csökkenés futás következtében elmarad, a viszcerális zsírmennyiség alacsonyabb szintje arra enged következtetni, hogy a testmozgás a testösszetétel megváltozásával (izomtömeg növekedés) eredményezheti a magasabb testtömeget, valamint a szervezet folyamatos fejlődési állapotával is számolnunk kell. [148]. Elhízás következtében károsodnak az inzulin-érzékeny szövetek, így inzulin jelenlétében a normálisnál kevesebb glükózt képesek csak felvenni, melynek következtében emelkedik a keringésben levő glükóz mennyisége, a normális biológiai válasz létrejöttéhez pedig

magasabb inzulin mennyiség szükséges. A fokozott inzulin igény kielégítésére a β-sejtek emelkedett inzulintermeléssel válaszolnak, míg ez a β-sejtek diszfunkciójához is vezethet. Kísérletünkben a SO nőstények éhomi vércukorszintje mindhárom diéta típus alkalmazásával azonos értékeket mutatott, míg ösztrogénhiányos nőstényeknél a 12 hetes zsírdús táplálkozás már az éhomi értékek tekintetében is emelte a vércukorszintet. A glükóz tolerancia vizsgálata során az OVX és/ vagy HT étrend növelte a vércukor értékeket, azonban a szabadidős testmozgás és a CR hatékony kezelési módnak bizonyult. Woods és mtsai. igazolták, hogy a magas zsírtartalmú étkezés következtében kialakuló károsodott glükóz tolerancia és csökkent inzulin érzékenység szerepet játszik az elhízáshoz társuló krónikus betegségek kialakulásában [149]. Az inzulinrezisztencia egy korai metabolikus rendellenesség, mely társítható a hiperglikémia, hiperlipidémia és a T2D kórképek megjelenésével. Szoros összefüggés figyelhető meg az elhízás és az inzulinrezisztencia kialakulása között, mely kapcsolatot két hipotézissel magyaráznak. A viszerális zsírszövetből történő fokozott FFA kiáramlás a portális vénába kerülve közvetlen hatást fejt ki a májban zajló metabolizmusra. További hipotézisül szolgál a viszcerális elhízással járó zsírsejt hipertrófia, valamint a belső szerveket érintő ektópiás zsír akkumuláció kedvezőtlen hatása az inzulin érzékenységre [150]. Az elhízás során kialakuló krónikus, alacsony intenzitású gyulladás következtében növekszik a keringésben és szövetekben található fehérvérsejtek száma és a gyulladásos citokinek szintje [151]. Az elhízással megjelenő inzulinrezisztencia legfőbb oka a plazma emelkedett FFA szintje, mely gátolja az inzulin által szabályzott glükózfelvételt és glikogénszintézist. Míg fiziológiás körülmények között az inzulin stimulálja a máj és az adipociták FFA felvételét és trigliceriddé történő átalakítását, inzulinrezisztencia során a zsírsejtek ezen képességei sérülnek, így emelkedik a keringésben levő FFA és triglicerid szint. A magasabb FFA gyulladási folyamatok indukálásával előlépteti az inzulinrezisztens állapot megjelenését [152-155]. A FFA és a toll-like receptor 4 (TLR4) interakciója során aktiválja az IκB/NF-κB jelátvitelt, illetve a citokin jelző szupresszor (SOCS3) útvonalakon keresztül modulálják a gyulladásos folyamatokat és inzulinrezisztencia kialakulását eredményezik [156-158]. Shi és mtsai. bizonyították, hogy a táplálkozási szokások megváltoztatásával a TLR4 kulcsszerepet játszik az energiaháztartás és az inzulinrezisztencia kialakulásának szabályozásában [159]. Gyulladás során az adipocitákat és májsejteket érintő inzulin szignalizáció számos mechanizmus által sérülhet [160]. A JNK jelátvitel az elsőként felfedezett olyan útvonal, mely a TNF-α kötődését követően szerepet játszik az inzulin szignalizáció gátlásában [161]. A JNK serkenti az IRS-1 szerin foszforilációját, csökkenti az IRS-1 tirozin foszforilációját, valamint

gátolja az Akt foszforilációját, mely folyamatok károsítják az inzulin jelátviteli folyamatokat. A JNK az AP-1 transzkripciós faktor aktivációja révén befolyásolja a génexpressziót. Gyulladás során a keletkező ROS a JNK útvonal aktiválásával szintén károsíthatja az inzulin szignalizációt [162]. A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPARγ) egy sejtmagi receptor, mely gátolja az NF-κB aktivitást és szerepet játszik a sejten belüli lipid szintézisben és zsírraktározásban, így egyértelműen az adipogenezis transzkripciós szabályzója. Ligandjai közé tartoznak a zsírsavak. A PPARγ aktivitásának csökkenése indukálja az inzulinrezisztencia kialakulását [163, 164]. Elhízás során emelkedik a zsírszövet adipokin termelése, a protektív hatású adiponektin szint pedig csökken, melynek eredményeként mérséklődik a NF-κB-re kifejtett gátló hatás [165]. Az elhízás, inzulinrezisztencia és a gyulladás kapcsolatát az adipocitákban és a májban vizsgálták, az összetett szignalizációs jelátviteli folyamatokat a 22. ábra mutatja be [7].



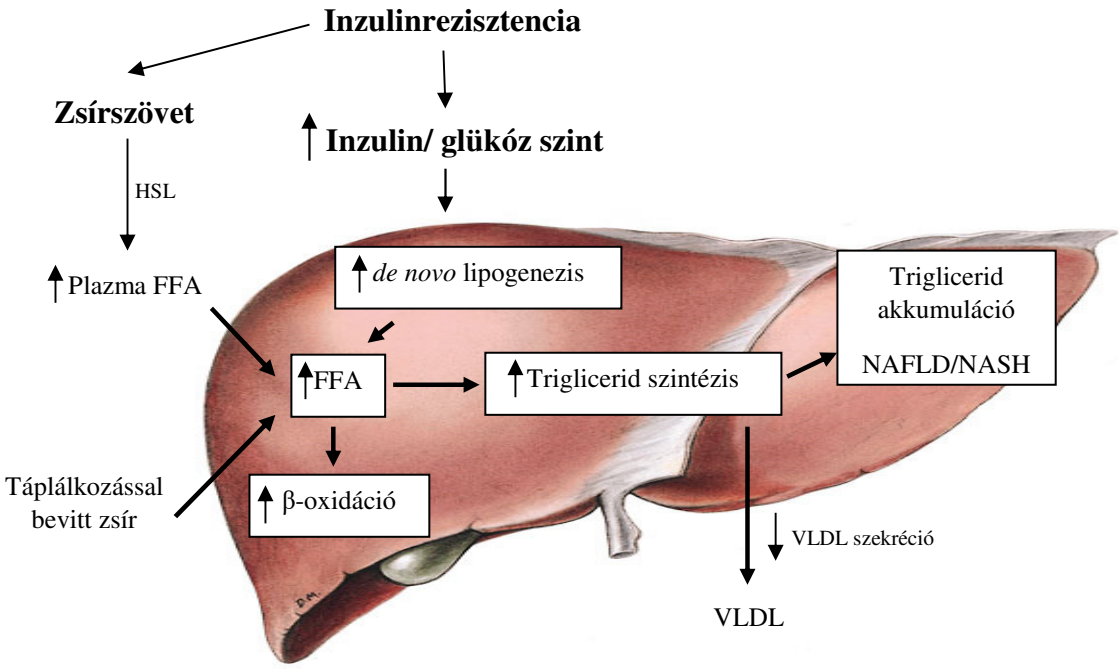
22. ábra: Az elhízás, gyulladási folyamatok és az inzulinrezisztencia kapcsolatát jellemző szignalizációs mechanizmusok

JNK: c Jun N-terminális kináz, IRS-1: inzulin receptor szubsztrát-1, Akt: protein kináz B, PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz, NF-κB: nukleáris faktor kappa-B, PPARγ: peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma, FFA: szabad zsírsav, ROS: reaktív oxigén származék

(Godsland és mtsai.,2010, nyomán [7])

Egyértelműen bizonyítottuk az energiadús táplálkozás, elhízás és az inzulinrezisztencia között fennálló ok-okozati kapcsolatot. SO nőstényeknél a magas triglicerid tartalmú táplálkozás szignifikáns inzulinszint növekedést eredményezett az éhomi és az OGTT-t követő értékek tekintetében egyaránt. SO állatoknál a CR önmagában és fizikai aktivitással kombinálva is sikeresen csökkentette a szérum inzulin szintet. A CR és a testmozgás protektív hatásait klinikai vizsgálatok is alátámasztják. Larson-Meyer és mtsai. igazolták, hogy a CR önmagában és testmozgással kiegészítve is javítja az inzulin érzékenységet, valamint csökkenti a β-sejtek érzékenységét túlsúlyos egyéneknél. Ösztrogénhiányos állapotban emelkedett inzulin szintet tapasztaltunk a SO állatokhoz képest. Míg a 12 hetes testmozgás és/vagy CR javította az SO állatok inzulin értékeit, OVX nőstényeknél nem tapasztaltunk jelentős javulást. A fennálló hiperinzulinémia fokozza az éhségérzetet és további elhízáshoz vezethet.

A nem alkoholos eredetű májelzsírosodás (NAFLD) szerzett metabolikus májbetegség, kialakulásnak okai az energiadús táplálkozás, ülő életmód, abdominális elhízás, diszlipidémia, magas vérnyomás, inzulinrezisztencia, valamint a károsodott glükóz tolerancia fennállása [166]. Számos tanulmány igazolja a NAFLD kialakulását posztmenopauzában levő, elhízott nők körében [167, 168]. A folyamat a rizikótényezők csökkentésével reverzibilis is lehet, azonban tartós fennállása gyulladási folyamatok megjelenéséhez (nem alkoholos steatohepatitis, NASH), kötőszövet felszaporodáshoz és kötőszövetes átépüléshez egyaránt vezethet [169, 170]. Noha a NAFLD nem tartozik a MS diagnózisának kritériumai közé, a NAFLD-t a metabolikus szindrómában szenvedők leggyakoribb májbetegségeként tartják számon [171, 172]. Inzulinrezisztens állapotban, a HSL gátló hatásának csökkenése a növeli a lipolízist és a FFA felszabadulást. A NAFLD és NASH kialakulásához vezető pathofiziológiai folyamatok során fokozódik a viszcerális zsírszövetből történő adipokin szekréció, a FFA többlet a portális vénába kerülve a máj magasabb FFA koncentrációját eredményezi. Az elhízás, az inzulinrezisztencia és a NAFLD kapcsolatát a 23. ábra mutatja be [2].



23. ábra: Az elhízás, az inzulinrezisztencia és a NAFLD kapcsolata

FFA: szabad zsírsav, HSL: hormon szenzitív lipáz, VLDL: nagyon alacsony denzitású lipoprotein, NAFLD: nem alkoholos zsírmáj, NASH: nem alkoholos steatohepatitis

(Paschos és mtsai., 2009, nyomán [2])

A NAFLD klinikai képe nem specifikus. A betegek 90%-a tünetmentes, néhány esetben előfordulhat puffadás, hasi diszkomfort érzés és fáradtság. A májat érintő sérülések legjelentősebb laboratóriumi paramétere a megváltozott ALT és AST szint, mely akár kétszeresére-háromszorosára is növekedhet. Az ALT a májsejtek citoszoljában található, míg az AST elsődleges előfordulási helye a mitokondrium, mely enzimek a májat érintő sérülést követően a keringésbe szekretálódnak. Kísérletünkben, ösztrogénhiányos nőstényeknél és zsírdús táplálkozást követően szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az AST és ALT enzimek tekintetében. Ovariektomizált nőstény állatoknál az ösztrogénhiány fokozza a máj zsírakkumulációját [173]. Eredményeink összhangban állnak azokkal a megfigyelésekkel, miszerint a menopauzát kísérő hormonális változásokkal járó testösszetétel változás, valamint az emelkedett inzulin és glükóz szint növeli a NAFLD kialakulását és progresszióját [84]. A NAFLD kezelése ma még nem megoldott kérdés, a terápia alapja a betegek életmódjának megváltoztatása, mely magába foglalja az egészséges étkezést és a rendszeres testmozgást. A rendszeres testmozgás pozitívan hat a testtömeg-kontrollra, és javítja a lipid akkumulációban

és a máj gyulladási folyamatait érintő génexpressziós folyamatokat [174, 175]. A munkánk során alkalmazott 12 hetes tréning protokoll és CR együttes hatása mérsékelte az AST és ALT enzimek koncentrációját. Cameron és mtsai. igazolták, hogy a testmozgás csökkenti az AST és ALT szintet MS patkány modellben [176]. Klinikai vizsgálatok bizonyítják, hogy az életmód megváltoztatása és a rendszeres testmozgás kiemelt szerepet játszik a NAFLD kezelésében idős korú nőknél [177]. A rendszeres testmozgás protektívnek bizonyul a lipid profil megváltoztatásában is.

9. Következtetések

Az eredményeink alapján a célkitűzésben feltett kérdéseinkre az alábbi válaszokat kaptuk:

1. Az első kísérletsorozatunkban a természetes öregedési folyamattal járó ösztrogénhiány, illetve a kísérletes menopauzát kísérő változásokat tanulmányoztuk.

    - Eredményeink igazolják, hogy mind a természetes úton kialakuló, mind pedig a kísérletesen (POVX, OVX) kiváltott ösztrogénhiányos állapot hasonló változásokat eredményezett a vizsgált paraméterek tekintetében. Menopauza következtében emelkedett a bal szívkamrában mért TNF-α és IL-6 gyulladáskeltő citokinek koncentrációja és a MPO enzim aktivitása. Ösztrogénhiányos nőstényeknél szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a HO enzim aktivitásában és a HO-1, HO-2 izoformák expressziójában, valamint súlyosbodott a szívizom iszkémiára való hajlam. SnPP előkezelést követően kontroll nőstényeknél kialakult az ST depresszió, míg ösztrogénhiányos állapotban ennek mértéke tovább súlyosbodott.

2. A második kísérletsorozatunkban 12 hetes kísérleti periódust követően vizsgáltuk az életmód (táplálkozás és testmozgás) befolyásoló hatásait fertilis és ösztrogénhiányos (OVX) nőstényekben.

    - Kísérletünk egyértelműen igazolja, hogy az ösztrogénhiányos állapot kedvezőtlenül befolyásolja a metabolikus értékeket. Az OVX következtében növekedett az állatok testtömege. A 12 hetes kísérleti periódus végén mért értékek jól mutatják, hogy az OVX már önmagában is emelte a vércukor, inzulin, leptin, triglicerid, AST és ALT szinteket, az energiadús táplálkozás pedig további növekedést eredményezett.

    - A 12 hetes periódus során alkalmazott szabadidős, futókerekes testmozgás és a kalóriamegvonás együttes hatása bizonyult a legeredményesebbnek a metabolikus paraméterek javításában. A 12 hetes fizikai aktivitás és kalóriamegvonás együttes hatása egy nem-farmakológiás kezelési módszernek

tekinthető a testtömeg-kontroll szabályozásában, a vércukor és inzulin értékek javításával, továbbá a leptin, triglicerid, AST és ALT értékek normalizálásával enyhíti a menopauzát kísérő metabolikus kórfolyamatokat.

10. Összefoglaló

A várható élettartam fokozatos kitolódásával a nők átlagos életkora eléri a 75-90 évet, azonban a menopauza megjelenésének ideje nem változott. Jelenleg a nők életük több, mint felét ösztrogénhiányos állapotban töltik, így a menopauzát kísérő kockázati tényezők felmérése és kezelése kiemelt közegészségügyi jelentőséggel bír. Epidemiológiai vizsgálatok igazolják, hogy menopauza után növekszik a nők kardiovaszkuláris veszélyeztetettsége, mely szoros összefüggésbe hozható az ösztrogén hatásainak megszűnésével. Reproduktív korú nőknél az ösztrogén genomiális és nem-genomiális válaszreakciók létrehozásával direkt vazodilatív és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki a szív-érrendszerre, így csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulását és progresszióját. Az ösztrogénszint esését követően a kardiovaszkuláris komplikációk mellett a lipid- és cukoranyagcsere folyamati is sérülnek, melynek eredményeként obezitás, a lipid profil megváltozása, csökkent glükóz tolerancia és inzulinrezisztencia kialakulása figyelhető meg. A hormonális védőhatás megszűnése már önmagában is növeli a menopauzában levő nők rizikóstátuszát, azonban az ülő életmód, a helytelen táplálkozási szokások, a dohányzás és a stressz tovább rontják a nők életkilátásait. A viszcerális zsírmennyiség növekedése elsődleges forrásnak tekinthető azon kóros folyamatok elindításában, melyek metabolikus zavarokhoz, gyulladási folyamatok megjelenéséhez és kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásához vezethetnek. Tekintettel a nők posztmenopauzában eltöltött életidejére, valamint a helytelen életvitellel járó metabolikus kockázati tényezők morbiditásra és mortalitásra gyakorolt hatásaira, a menopauzát kísérő kórfolyamatok feltérképezése, valamint a posztmenopauzális panaszok kezelésére irányuló lehetőségek intenzív kutatás alatt állnak.

Munkánk során a természetes öregedési folyamattal járó ösztrogénhiány, valamint a mesterséges menopauza hatásait vizsgáltuk a gyulladásos és keringési paraméterek tekintetében. Miután felmértük a menopauzát kísérő elváltozásokat, tisztázni kívántuk, hogy a táplálkozási szokások, illetve a testmozgás jelenléte/hiánya hogyan módosítja a metabolikus értékeket. Kísérletünkben a menopauzát kísérő kóros elváltozások kezelésére nem gyógyszeres, alternatív terápiás lehetőséget választottunk. A testmozgás rendszerességével és/vagy a megfelelő diétás kiegészítéssel kialakított életmódváltás számos kockázati tényező együttes korrekciójával javíthatja a rizikóprofilt.

Első kísérletsorozatunkban, a természetes öregedési folyamattal járó elváltozások tanulmányozására 24 hónapos, ovárium-intakt, idős nőstény Wistar patkányokat vizsgáltunk, míg a kísérletes menopauza hatásainak elemzését farmakológiailag kezelt (POVX, 750 µg/kg triptorelin, *i.m.,* minden 4. héten)- és sebészi úton, bilaterális ovariektómiával (OVX) előidézett ösztrogénhiányos nőstény állatokon végeztük. Biokémiai mérések során meghatároztuk a bal szívkamrában mért tumor nekrózis faktor-alfa (TNF-α) és interleukin-6 (IL-6) gyulladásos citokinek koncentrációját, a mieloperoxidáz (MPO) és hem-oxigenáz (HO) enzimek aktivitását, illetve a HO-1 és HO-2 izoformák expresszióját. A HO egy mikroszómaenzim, mely a hem oxidatív degradációja során ekvimoláris mennyiségű biliverdint, szabad vasiont, és szén-monoxidot (CO) szabadít fel. A felszabaduló biliverdin/bilirubin és a CO gyulladáscsökkentő, antiapoptotikus, immunmodulátor és vazodilatátor funkciójuk révén, valamint az antioxidáns/oxidáns homeosztázis fenntartásával protektív funkcióval bírnak a kardiovaszkuláris rendszerben. A szívizom iszkémiára való hajlam, valamint a HO aktivitás gátlás (ón-protoprofirin IX., SnPP; 30 µmol/kg, s.c., pH7,4) hatásának vizsgálatához az EKG ST szegmens változását használtuk. Természetes és mesterséges ösztrogénhiányt (POVX és OVX) követően emelkedett a gyulladásos paraméterek (TNF-α, IL-6 és MPO) jelenléte, valamint csökkent a HO enzim aktivitása, illetve a HO-1/HO-2 izoformák expressziója. A HO enzimek aktivitásának csökkenésével mérséklődik a felszabaduló biliverdin/ bilirubin és CO végtermékek gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatása, mely hozzájárul a gyulladásos paraméterek koncentrációjának növekedéséhez. SnPP előkezelést alkalmazva, mely a HO aktivitás kompetitív inhibítora, súlyosbodott a szívizom iszkémiára való hajlam.

Az ösztrogénhiányt kísérő kockázati tényezők felmérését követően az életmód (táplálkozás típusa, testmozgás) befolyásoló hatásait is vizsgáltuk. Áloperált (SO) és OVX nőstény patkányokat 12 hetes kísérleti periódusnak vetettük alá, mely során a diéta típusától függően és a tréning alapján további csoportokat alakítottunk ki. A diéta típusa normál mennyiségű tápot (CTRL), magas triglicerid tartalmú étkezést 40 %-os zsírtartalommal (HT), vagy 50 %-os kalóriamegvonásos diétát (CR) jelentett. A tréninget végző állatokat futókerékkel felszerelt ketrecekben helyeztük el, szabad hozzáférést biztosítva a kerékhez a nap 24 órájában. A tréning protokollt szabadidős testmozgásként definiáltuk. A 12 hetes kísérleti periódus végén vizsgáltuk az állatok testtömeg változását, glükózterhelésre adott válaszát, valamint az inzulin, leptin, triglicerid, aszpartát aminotranszferáz (AST) és alanin aminotranszferáz (ALT) szinteket. Eredményeink igazolják, hogy az ösztrogénhiány, illetve zsírdús táplálkozás

következtében növekedett a patkányok testtömege. A túlzott energia-bevitel a zsírsejtek funkcióbeli megváltozását és az inzulin-érzékeny szövetek károsodását eredményezi. Az elhízás perzisztáló gyulladásos folyamatokkal, az inzulin érzékenység csökkenésével, valamint a glükóz- háztartás zavarával jellemezhető kórállapot, mely szerepet játszik a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában és progressziójában. Kísérletünk egyértelműen bizonyítja az ösztrogénhiány, energiadús táplálkozás, az elhízás és a metabolikus komplikációk közötti ok-okozati összefüggést. A menopauza már önmagában is kedvezőtlen hatással bír a metabolikus paraméterekre, amit a helytelen táplálkozás és a testmozgás hiánya tovább súlyosbított. OVX állatokban, kiemelten a HT csoport tekintetében emelkedett a plazma triglicerid és leptin szint, károsodott a glükóz tolerancia és inzulinrezisztencia alakult ki. A nem alkoholos zsírmáj (NAFLD) szerzett metabolikus májbetegség, melynek rizikófaktorai az energiadús táplálkozás, ülő életmód, abdominális elhízás és az inzulinrezisztencia. A NAFLD kialakulásához vezető kórfolyamatok során fokozódik az adipokin szekréció, valamint emelkedik a szabad zsírsav (FFA) koncentrációja. Elhízás során a FFA a portális vénán keresztül közvetlenül a májba jut, ahol a megnövekedett FFA koncentráció triglicerid felhalmozódáshoz vezet. A májat érintő sérülések legjelentősebb laboratóriumi paramétere a megváltozott AST és ALT szint. Kísérletünkben, ösztrogénhiányos nőstényeknél és zsírdús táplálkozást követően szignifikánsan emelkedett az AST és ALT enzimek koncentrációja.

A posztmenopauzális komplikációk terápiája megvalósulhat gyógyszeres és nem gyógyszeres kezeléssel. Munkánk során az életmód (fizikai aktivitás és táplálkozás) jelentőségét vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a rendszeres testmozgás, a megfelelő kalóriamegvonásos diétás kiegészítéssel alkalmas terápiának bizonyul posztmenopauzában. A kísérletünkben alkalmazott 12 hetes szabadidős testmozgás, valamint az 50 %-os kalóriamegvonás külön-külön is javították a metabolikus értékeket, azonban ezek együttes hatása bizonyult a legeredményesebbnek. Az egészséges életmód megválasztása a szénhidrát és lipid profilt-, valamint a májat érintő pathológiás elváltozások megjelenésének késleltetésére és a már fennálló rendellenességek kezelésének leghatékonyabb módszere. A kiegyensúlyozott étrend és a rendszeres testmozgás beiktatásával a metabolikus paraméterek és az általuk okozott szövődmények kialakulása és progressziója bármikor lassítható vagy akár meg is állítható, mely változások javíthatják a posztmenopauzában levő nők életkilátásait.

11. Summary

The average life expectancy for women exceeds 75-90 years, however, the onset of menopause has not changed. Currently, women spend more than half of their lifetime in a state of estrogen deficiency, thus assessing and managing risk factors accompanying the menopause are of great public health importance. Epidemiological studies revealed that cardiovascular risk rises after menopause, which can be closely associated with the cessation of estrogen effects. Through both genomic and non-genomic signaling mechanisms, estrogen has a direct vasodilative and anti-inflammatory impact on the cardiovascular system, thus reducing the incidence and progression of cardiovascular diseases. In addition to cardiovascular complications, estrogen deficiency contributes to alterations in the lipid and glucose homeostasis which result in obesity, lipid profile changes, reduced glucose tolerance, and development of insulin resistance. While the termination of hormonal protective effects increases the risk state of postmenopausal women in itself, a sedentary lifestyle, poor diet, smoking and stress further deteriorate the life expectancy of women. Excess visceral adipose tissue accumulation is considered to be a primary source of pathological processes, which may lead to metabolic disorders, inflammatory processes and cardiovascular diseases. Considering the duration of women's lifetime in estrogen-depleted conditions and the impact of unhealthy lifestyle-induced metabolic complications on morbidity and mortality, understanding pathological mechanisms underlying the menopause-induced alterations as well as interventional strategies against postmenopausal symptoms are under intense research.

In our study, we examined the effects of both age-related natural estrogen deficiency and experimental menopause on inflammatory and cardiac parameters. After assessment of alterations accompanying menopause, our aim was to clarify how nutrition and physical exercise alter metabolic values. To manage the pathological changes accompanying menopause, a non-pharmacological, alternative treatment strategy was chosen in our work. Lifestyle changes involving regular physical exercise and/or an efficient dietary intervention combined with improvement of a number of risk factors may improve the risk profile.

In our first experiment, 24-month-old, ovary-intact aged female Wistar rats were used to investigate the effects of age-related natural menopause. Experimental estrogen deficiency was induced pharmacologically (POVX, 750 µg/kg triptorelin im. every 4th week) or surgically with bilateral ovariectomy surgery (OVX). Using biochemical measurements, we

measured the concentrations of pro-inflammatory tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6), the activity of myeloperoxidase (MPO) and heme oxygenase (HO) enzymes and the expression of HO-1 and HO-2 isoforms in cardiac left ventricle. HO is the rate-limiting enzyme in the oxidative degradation of heme to yield equimolar amounts of biliverdin, free iron, and carbon monoxide (CO). With the anti-inflammatory, antiapoptotic, immunomodulatory, and vasodilative effects and the maintance of the antioxidant/oxidant homeostasis, the released biliverdin/bilirubin and CO have a protective function in the cardiovascular system. Electrocardiogram ST segment changes were used to detect cardiac ischemia susceptibility and the effect of HO blockade (tin protoporphyrin IX., SnPP, 30 µmol/kg sc., pH 7.4).

We found that natural and experimental estrogen withdrawal (POVX and OVX) increased the presence of inflammatory biomarkers (TNF-α, IL-6 and MPO), decreased HO enzyme activity and the expression of HO-1 and HO-2 isoforms. Reduction of HO enzymatic activity attenuates the anti-inflammatory and antioxidant effects of biliverdin/bilirubin and CO byproducts, which contribute to increased levels of inflammatory parameters. Pretreatment with SnPP, which is a competitive inhibitor of HO activity, augmented cardiac ischemia susceptibility.

After the assessment of the risk factors accompanying estrogen deficiency, we studied the influence of lifestyle (type of diet and physical exercise) as well. Sham-operated (SO) and ovariectomized female Wistar rats were used in the 12-week-long experimental period. SO and OVX groups were randomized into new groups based on the type of diet and training. Rats were fed standard chow (CTRL), high triglyceride diet (HT) with 40 % fat or 50 % calorie-restricted diet (CR). The exercising animals were placed into cages fitted with a running-wheel and were allowed free access to the wheel for 24 hours per day. The training protocol was defined as a voluntary wheel-running model. At the end of the 12-week experimental period body weight gain, glucose sensitivity, and levels of serum insulin, plasma triglyceride, leptin and aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured. Our results verify that OVX and HT diet caused an increase in body weight. Excessive energy intake leads to the functional alteration of adipocytes and damages insulin sensitive tissues. Obesity is a pathological condition and characterized by low grade inflammation, low insulin sensitivity and altered glucose homeostasis, which play a role in the development and progression of cardiovascular diseases. Our experiment clearly demonstrates

the causality among estrogen deficiency, energy-dense nutrition, obesity and metabolic complications. Menopause by itself has a negative impact on metabolic parameters, which is exacerbated by the poor diet and the lack of physical exercise. OVX animals, especially in the HT groups, showed elevated triglyceride and leptin levels, impaired glucose tolerance and the onset of insulin resistance. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a metabolic liver disease, which is related to energy-dense diet, sedentary lifestyle, abdominal obesity and insulin resistance. In the hallmark feature of the pathogenesis of NAFLD, both adipokine secretion and free fatty acid concentration increase. In obesity, FFA can directly enter the liver via the portal circulation, and increased levels of hepatic FFA leading to triglyceride accumulation. The most common laboratory parameters of liver damage are the elevated AST and ALT values. In our study, estrogen deficiency and HT diet caused a significant increase in the concentrations of AST and ALT.

Both pharmacological and non-pharmacological treatment strategies are used to manage postmenopausal complications. In our work we studied the significance of lifestyle (physical activity and nutrition) and established that regular physical exercise combined with an efficient dietary intervention can be a potential non-pharmacological treatment in menopause. In our experiment, the metabolic parameters were improved, in part, by 12-week voluntary exercise or 50 % CR, but most effectively by a combination of the two. Choosing a healthy lifestyle can be a very effective strategy in the treatment of already existing disorders and it is also effective to delay the incidence of pathological alterations related to lipid and glucose homeostasis and liver damage. The incidence and progression of metabolic disorders and the caused complications can be slowed down and stopped by a balanced diet and regular physical exercise and consequently may improve the life expectancy of postmenopausal women.

12. Irodalomjegyzék

1. Chakrabarti, S., J.S. Morton, and S.T. Davidge, *Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview.* Can J Cardiol, 2014. **30**(7): p. 705-12.

2. Paschos, P. and K. Paletas, *Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome.* Hippokratia, 2009. **13**(1): p. 9-19.

3. Poehlman, E.T., *Menopause, energy expenditure, and body composition.* Acta Obstet Gynecol Scand, 2002. **81**(7): p. 603-11.

4. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase.* Pharmacol Rev, 2008. **60**(1): p. 79-127.

5. Shao, W. and M. Brown, *Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy.* Breast Cancer Res, 2004. **6**(1): p. 39-52.

6. North, B.J. and D.A. Sinclair, *The intersection between aging and cardiovascular disease.* Circ Res, 2012. **110**(8): p. 1097-108.

7. Godsland, I.F., *Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer.* Clin Sci (Lond), 2009. **118**(5): p. 315-32.

8. Kim, J.H., H.T. Cho, and Y.J. Kim, *The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation.* Endocr J, 2014. **61**(11): p. 1055-67.

9. Murphy, E., *Estrogen signaling and cardiovascular disease.* Circ Res, 2011. **109**(6): p. 687-96.

10. Gouva, L. and A. Tsatsoulis, *The role of estrogens in cardiovascular disease in the aftermath of clinical trials.* Hormones (Athens), 2004. **3**(3): p. 171-83.

11. Guarner-Lans, V., et al., *Relation of aging and sex hormones to metabolic syndrome and cardiovascular disease.* Exp Gerontol, 2011. **46**(7): p. 517-23.

12. Freeman, E.W., et al., *Obesity and reproductive hormone levels in the transition to menopause.* Menopause, 2010. **17**(4): p. 718-26.

13. Glass, C.K. and J.M. Olefsky, *Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 635-45.

14. World Health Organization, W., *Obesity and Overweight Fact sheets.* http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/, 2015.

15. Tsutsumi, S., et al., *Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2.* J Endocrinol, 2008. **199**(2): p. 267-73.

16. Gavin, K.M., et al., *Vascular endothelial estrogen receptor alpha is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3513-20.

17. Pinzone, J.J., et al., *Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(11): p. 4605-12.

18. Zhao, C., et al., *Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells.* Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3955-62.

19. van Rooij, E., et al., *Myocyte enhancer factor 2 and class II histone deacetylases control a gender-specific pathway of cardioprotection mediated by the estrogen receptor.* Circ Res, 2010. **106**(1): p. 155-65.

20. Revankar, C.M., et al., *Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30.* ACS Chem Biol, 2007. **2**(8): p. 536-44.

21. Madeo, A. and M. Maggiolini, *Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts.* Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 6036-46.

22. Li, Z.L., et al., *Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the GPR30 agonist G1 in experimental diabetes mellitus.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38787.

23. Szego, C.M. and J.S. Davis, *Inhibition of estrogen-induced elevation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in rat uterus. I. By beta-adrenergic receptor-blocking drugs.* Mol Pharmacol, 1969. **5**(5): p. 470-80.

24. Pedram, A., et al., *A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane.* J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22278-88.

25. Pedram, A., M. Razandi, and E.R. Levin, *Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane.* Mol Endocrinol, 2006. **20**(9): p. 1996-2009.

26. Chambliss, K.L., et al., *Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2319-30.

27. Zhao, C., K. Dahlman-Wright, and J.A. Gustafsson, *Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}.* J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39575-9.

28. Wu, Q., et al., *Non-nuclear estrogen receptor signaling in the endothelium.* J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 14737-43.

29. Tang, H.Y., et al., *Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor.* Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3265-72.

30. Chambliss, K.L., et al., *Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae.* Circ Res, 2000. **87**(11): p. E44-52.

31. Lekontseva, O., et al., *Role of neuronal nitric-oxide synthase in estrogen-induced relaxation in rat resistance arteries.* J Pharmacol Exp Ther, 2011. **339**(2): p. 367-75.

32. Miller, A.A., et al., *Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen.* Stroke, 2007. **38**(7): p. 2142-9.

33. 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.

34. Desbuards, N., et al., *Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis.* Thromb Haemost, 2007. **98**(3): p. 614-20.

35. Yin, X.J., et al., *Roles of reactive oxygen species and heme oxygenase-1 in modulation of alveolar macrophage-mediated pulmonary immune responses to Listeria monocytogenes by diesel exhaust particles.* Toxicol Sci, 2004. **82**(1): p. 143-53.

36. Zhong, Y., et al., *Heme oxygenase-1-mediated reactive oxygen species reduction is involved in the inhibitory effect of curcumin on lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in RAW264.7 macrophages.* Mol Med Rep, 2013. **7**(1): p. 242-6.

37. Wu, G., et al., *Phosphorylation and hypoxia-induced heme oxygenase-1 gene expression in cardiomyocytes.* J Card Fail, 2004. **10**(6): p. 519-26.

38. Yet, S.F., et al., *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice.* Circ Res, 2001. **89**(2): p. 168-73.

39. Hsieh, C.Y., et al., *Regulation of shear-induced nuclear translocation of the Nrf2 transcription factor in endothelial cells.* J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 12.

40. Durante, W., et al., *Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 1997. **80**(4): p. 557-64.

41. Loboda, A., et al., *Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(10): p. 1767-812.

42. 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.

43. Kappas, A., *A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin.* Pediatrics, 2004. **113**(1 Pt 1): p. 119-23.

44. Mreihil, K., et al., *Early isomerization of bilirubin in phototherapy of neonatal jaundice.* Pediatr Res, 2010. **67**(6): p. 656-9.

45. Morse, D. and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1: from bench to bedside.* Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(6): p. 660-70.

46. Foresti, R., C.J. Green, and R. Motterlini, *Generation of bile pigments by haem oxygenase: a refined cellular strategy in response to stressful insults.* Biochem Soc Symp, 2004(71): p. 177-92.

47. Ollinger, R., et al., *Bilirubin and biliverdin treatment of atherosclerotic diseases.* Cell Cycle, 2007. **6**(1): p. 39-43.

48. Li, M., et al., *Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1526-35.

49. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation.* Science, 2008. **320**(5876): p. 667-70.

50. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway.* Nat Med, 2000. **6**(4): p. 422-8.

51. Soares, M.P., et al., *Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation.* J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3553-63.

52. Otterbein, L.E., et al., *Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury.* Nat Med, 2003. **9**(2): p. 183-90.

53. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation.* Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.

54. Xing, D., et al., *Estrogen and mechanisms of vascular protection.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(3): p. 289-95.

55. Ghisletti, S., et al., *17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 2957-68.

56. Pelzer, T., et al., *Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF-kappaB DNA binding by estrogen receptor-alpha and -beta.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): p. 1153-7.

57. An, J., et al., *Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens.* J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17808-14.

58. Pfeilschifter, J., et al., *Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause.* Endocr Rev, 2002. **23**(1): p. 90-119.

59. Posa, A., et al., *Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat.* Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 2176749.

60. Barros, R.P. and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptors and the metabolic network.* Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 289-99.

61. Bjornholm, M. and J.R. Zierath, *Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes.* Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 2): p. 354-7.

62. Rogers, N.H., et al., *Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(4): p. 646-50.

63. D'Eon, T.M., et al., *Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways.* J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 35983-91.

64. Clegg, D.J., et al., *Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin.* Diabetes, 2006. **55**(4): p. 978-87.

65. Naaz, A., et al., *Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta).* Horm Metab Res, 2002. **34**(11-12): p. 758-63.

66. Bryzgalova, G., et al., *Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver.* Diabetologia, 2006. **49**(3): p. 588-97.

67. Gallagher, C.J., et al., *Association of the estrogen receptor-alpha gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study.* Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2135-41.

68. Yepuru, M., et al., *Estrogen receptor-{beta}-selective ligands alleviate high-fat diet- and ovariectomy-induced obesity in mice.* J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31292-303.

69. Nadal, A., et al., *The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **304**(1-2): p. 63-8.

70. Barros, R.P., et al., *Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E124-33.

71. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.

72. Carter, S., et al., *Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients.* Clin Interv Aging, 2013. **8**: p. 829-44.

73. Valassi, E., M. Scacchi, and F. Cavagnini, *Neuroendocrine control of food intake.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008. **18**(2): p. 158-68.

74. Davis, J.F., D.L. Choi, and S.C. Benoit, *Insulin, leptin and reward.* Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(2): p. 68-74.

75. Mitra, S.W., et al., *Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha.* Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 2055-67.

76. Merchenthaler, I., et al., *Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses.* J Comp Neurol, 2004. **473**(2): p. 270-91.

77. Lindell, K., et al., *Leptin receptor 5'untranslated regions in the rat: relative abundance, genomic organization and relation to putative response elements.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **172**(1-2): p. 37-45.

78. Mishra, G.D. and D. Kuh, *Health symptoms during midlife in relation to menopausal transition: British prospective cohort study.* BMJ, 2012. **344**: p. e402.

79. Li, Q., et al., *Current understanding of ovarian aging.* Sci China Life Sci, 2012. **55**(8): p. 659-69.

80. Donato, G.B., et al., *Association between menopause status and central adiposity measured at different cutoffs of waist circumference and waist-to-hip ratio.* Menopause, 2006. **13**(2): p. 280-5.

81. Miller, V.M., et al., *Sex-specific risk of cardiovascular disease and cognitive decline: pregnancy and menopause.* Biol Sex Differ, 2013. **4**(1): p. 6.

82. Tchernof, A., E.T. Poehlman, and J.P. Despres, *Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy.* Diabetes Metab, 2000. **26**(1): p. 12-20.

83. Rodriguez, A., et al., *Visceral and subcutaneous adiposity: are both potential therapeutic targets for tackling the metabolic syndrome?* Curr Pharm Des, 2007. **13**(21): p. 2169-75.

84. Suzuki, A. and M.F. Abdelmalek, *Nonalcoholic fatty liver disease in women.* Womens Health (Lond Engl), 2009. **5**(2): p. 191-203.

85. Florentino, G.S., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease in menopausal women.* Arq Gastroenterol, 2013. **50**(3): p. 180-5.

86. Lakatta, E.G. and D. Levy, *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease.* Circulation, 2003. **107**(1): p. 139-46.

87. Lakatta, E.G. and D. Levy, *Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease.* Circulation, 2003. **107**(2): p. 346-54.

88. Brandes, R.P., I. Fleming, and R. Busse, *Endothelial aging.* Cardiovasc Res, 2005. **66**(2): p. 286-94.

89. Veronica, G. and R.R. Esther, *Aging, metabolic syndrome and the heart.* Aging Dis, 2012. **3**(3): p. 269-79.

90. Risk, M.-G.C.o.G.S.f.M.H.T.R.B.C., *Postmenopausal estrogen monotherapy-associated breast cancer risk is modified by CYP17A1_-34_T>C polymorphism.* Breast Cancer Res Treat, 2010. **120**(3): p. 737-44.

91. Lambrinoudaki, I., *Progestogens in postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer.* Maturitas, 2014. **77**(4): p. 311-7.

92. Narod, S.A., *Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer.* Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(11): p. 669-76.

93. Canonico, M., *Hormone therapy and hemostasis among postmenopausal women: a review.* Menopause, 2014. **21**(7): p. 753-62.

94. Lakryc, E.M., et al., *What is the influence of hormone therapy on homocysteine and crp levels in postmenopausal women?* Clinics (Sao Paulo), 2015. **70**(2): p. 107-13.

95. Dinger, J., K. Bardenheuer, and K. Heinemann, *Drospirenone plus estradiol and the risk of serious cardiovascular events in postmenopausal women.* Climacteric, 2016: p. 1-8.

96. Francucci, C.M., et al., *Effects of raloxifene on body fat distribution and lipid profile in healthy post-menopausal women.* J Endocrinol Invest, 2005. **28**(7): p. 623-31.

97. Francucci, C.M., P. Romagni, and M. Boscaro, *Raloxifene: bone and cardiovascular effects.* J Endocrinol Invest, 2005. **28**(10 Suppl): p. 85-9.

98. Posa, A., I. Pavo, and C. Varga, *Heme oxygenase contributes to estradiol and raloxifene-induced vasorelaxation in estrogen deficiency.* Int J Cardiol, 2015. **189**: p. 252-4.

99. Asikainen, T.M., K. Kukkonen-Harjula, and S. Miilunpalo, *Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials.* Sports Med, 2004. **34**(11): p. 753-78.

100. Egan, B. and J.R. Zierath, *Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation.* Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 162-84.

101. Zois, C., et al., *Lipoprotein profile, glycemic control and physical fitness after strength and aerobic training in post-menopausal women with type 2 diabetes.* Eur J Appl Physiol, 2009. **106**(6): p. 901-7.

102. Roussel, M., et al., *Influence of a walking program on the metabolic risk profile of obese postmenopausal women.* Menopause, 2009. **16**(3): p. 566-75.

103. Di Francescomarino, S., et al., *The effect of physical exercise on endothelial function.* Sports Med, 2009. **39**(10): p. 797-812.

104. Leung, F.P., et al., *Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1).* Sports Med, 2008. **38**(12): p. 1009-24.

105. McCay, C.M., M.F. Crowell, and L.A. Maynard, *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935.* Nutrition, 1989. **5**(3): p. 155-71; discussion 172.

106. Smyers, M.E., et al., *Physically active rats lose more weight during calorie restriction.* Physiol Behav, 2015. **139**: p. 303-13.

107. Canto, C. and J. Auwerx, *Caloric restriction, SIRT1 and longevity.* Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(7): p. 325-31.

108. Edwards, I.J., et al., *Caloric restriction in rhesus monkeys reduces low density lipoprotein interaction with arterial proteoglycans.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998. **53**(6): p. B443-8.

109. Wang, Z., et al., *Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice.* Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2845-53.

110. Jung, K.J., et al., *Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF-kB and AP-1 in aged rat kidney.* Inflamm Res, 2009. **58**(3): p. 143-50.

111. Ahmet, I., et al., *Effects of calorie restriction on cardioprotection and cardiovascular health.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(2): p. 263-71.

112. Lee, C.K., et al., *Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14988-93.

113. Dhahbi, J.M., et al., *Gene expression and physiologic responses of the heart to the initiation and withdrawal of caloric restriction.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(3): p. 218-31.

114. Merry, B.J., *Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1340-54.

115. Bevilacqua, L., et al., *Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(5): p. E852-61.

116. Acs, N., et al., *Effects of combined sex hormone replacement therapy on small artery biomechanics in pharmacologically ovariectomized rats.* Maturitas, 2000. **34**(1): p. 83-92.

117. Szalai, Z., et al., *Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system.* Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 925981.

118. Posa, A., et al., *Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase.* Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 521563.

119. 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.

120. 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.

121. Malutan, A.M., et al., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause.* Prz Menopauzalny, 2014. **13**(3): p. 162-8.

122. Sarkar, D. and P.B. Fisher, *Molecular mechanisms of aging-associated inflammation.* Cancer Lett, 2006. **236**(1): p. 13-23.

123. Maggio, M., et al., *Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(6): p. 575-84.

124. Cook, N.L., et al., *Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase activity and perturb Ca2+ homeostasis in human coronary artery endothelial cells.* Free Radic Biol Med, 2012. **52**(5): p. 951-61.

125. Roman, R.M., A.E. Wendland, and C.A. Polanczyk, *Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice.* Arq Bras Cardiol, 2008. **91**(1): p. e11-9.

126. Zhang, R., et al., *Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease.* JAMA, 2001. **286**(17): p. 2136-42.

127. Li, S.H., et al., *[Clinical implications of relationship between myeloperoxidase and acute coronary syndromes].* Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2007. **35**(3): p. 241-4.

128. Oren, H., et al., *Role of novel biomarkers of inflammation in patients with stable coronary heart disease.* Angiology, 2007. **58**(2): p. 148-55.

129. Koenig, W. and N. Khuseyinova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 15-26.

130. Karakas, M. and W. Koenig, *Myeloperoxidase production by macrophage and risk of atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(3): p. 277-83.

131. Stocker, R., et al., *Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 2028-33.

132. Khan, S.Q., et al., *Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction.* Heart, 2007. **93**(7): p. 826-31.

133. Cavusoglu, E., et al., *Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome.* Am J Cardiol, 2007. **99**(10): p. 1364-8.

134. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis.* Circulation, 2008. **117**(2): p. 231-41.

135. Wang, G., et al., *Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart.* Circulation, 2010. **121**(17): p. 1912-25.

136. Kim, O.Y., et al., *Effects of aging and menopause on serum interleukin-6 levels and peripheral blood mononuclear cell cytokine production in healthy nonobese women.* Age (Dordr), 2012. **34**(2): p. 415-25.

137. Ross, J.L. and S.E. Howlett, *Age and ovariectomy abolish beneficial effects of female sex on rat ventricular myocytes exposed to simulated ischemia and reperfusion.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38425.

138. Schwertner, H.A., W.G. Jackson, and G. Tolan, *Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease.* Clin Chem, 1994. **40**(1): p. 18-23.

139. Wade, G.N., *Regulation of body fat content?* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(1): p. R14-5.

140. Lovejoy, J.C., et al., *Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(6): p. 949-58.

141. Mathieu, P., I. Lemieux, and J.P. Despres, *Obesity, inflammation, and cardiovascular risk.* Clin Pharmacol Ther, 2010. **87**(4): p. 407-16.

142. Perez, J.A., et al., *Epidemiology of risk factors and symptoms associated with menopause in Spanish women.* Maturitas, 2009. **62**(1): p. 30-6.

143. Schenck-Gustafsson, K., *Risk factors for cardiovascular disease in women.* Maturitas, 2009. **63**(3): p. 186-90.

144. Fock, K.M. and J. Khoo, *Diet and exercise in management of obesity and overweight.* J Gastroenterol Hepatol, 2013. **28 Suppl 4**: p. 59-63.

145. Ghosh, S., et al., *Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview.* Clin Sci (Lond), 2010. **119**(2): p. 57-74.

146. Trepanowski, J.F., et al., *Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings.* Nutr J, 2011. **10**: p. 107.

147. Damirchi, A., et al., *Effects of aerobic exercise training on visceral fat and serum adiponectin concentration in ovariectomized rats.* Climacteric, 2010. **13**(2): p. 171-8.

148. Shinoda, M., M.G. Latour, and J.M. Lavoie, *Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(3): p. 335-43.

149. Woods, S.C., et al., *A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats.* J Nutr, 2003. **133**(4): p. 1081-7.

150. Boren, J., et al., *Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship.* J Intern Med, 2013. **274**(1): p. 25-40.

151. Emanuela, F., et al., *Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome.* J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 476380.

152. Heilbronn, L., S.R. Smith, and E. Ravussin, *Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 4**: p. S12-21.

153. Boden, G., et al., *Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver.* Diabetes, 2005. **54**(12): p. 3458-65.

154. Boden, G., *Free fatty acids and insulin secretion in humans.* Curr Diab Rep, 2005. **5**(3): p. 167-70.

155. Karpe, F., J.R. Dickmann, and K.N. Frayn, *Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation.* Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2441-9.

156. Shi, H., et al., *Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling.* J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34733-40.

157. Cai, D., et al., *Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB.* Nat Med, 2005. **11**(2): p. 183-90.

158. Teng, K.T., et al., *Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence.* Nutr J, 2014. **13**: p. 12.

159. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.

160. Ye, J., *Mechanisms of insulin resistance in obesity.* Front Med, 2013. **7**(1): p. 14-24.

161. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307).* J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.

162. Nishikawa, T., et al., *Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance.* Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77 Suppl 1**: p. S161-4.

163. Kintscher, U. and R.E. Law, *PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(2): p. E287-91.

164. Leonardini, A., et al., *Cross-Talk between PPARgamma and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity.* PPAR Res, 2009. **2009**: p. 818945.

165. Ouchi, N., et al., *Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway.* Circulation, 2000. **102**(11): p. 1296-301.

166. Pacifico, L., et al., *Pediatric nonalcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and cardiovascular risk.* World J Gastroenterol, 2011. **17**(26): p. 3082-91.

167. Bruno Ade, S., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women.* Climacteric, 2014. **17**(4): p. 465-71.

168. Gutierrez-Grobe, Y., et al., *Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, posmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens.* Ann Hepatol, 2010. **9**(4): p. 402-9.

169. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.* Hepatology, 2006. **44**(4): p. 865-73.

170. Sanches, S.C., et al., *Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 574832.

171. Seo, H.I., et al., *Which metabolic syndrome criteria best predict the presence of non-alcoholic fatty liver disease?* Diabetes Res Clin Pract, 2012. **95**(1): p. 19-24.

172. Vanni, E., et al., *From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa?* Dig Liver Dis, 2010. **42**(5): p. 320-30.

173. Barsalani, R., N.A. Chapados, and J.M. Lavoie, *Hepatic VLDL-TG production and MTP gene expression are decreased in ovariectomized rats: effects of exercise training.* Horm Metab Res, 2010. **42**(12): p. 860-7.

174. Pighon, A., et al., *Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver.* Metabolism, 2011. **60**(5): p. 629-39.

175. Lavoie, J.M. and A. Pighon, *NAFLD, Estrogens, and Physical Exercise: The Animal Model.* J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 914938.

176. Cameron, I., et al., *Endurance exercise in a rat model of metabolic syndrome.* Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(11): p. 1490-7.

177. Frith, J. and J.L. Newton, *Liver disease in older women.* Maturitas, 2010. **65**(3): p. 210-4.

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Varga Csaba egyetemi docensnek hogy már szakdolgozó éveimtől kezdve támogatott és biztosította számomra a kutatás feltételeit.

Nagyon hálás vagyok Dr. Pósa Anikó egyetemi adjunktusnak, akinek szakmai észrevételei, útmutatásai és tanácsai nélkülözhetetlenek voltak a munkám elkészítéséhez.

Köszönetem szeretném kifejezni egykori és jelenlegi tanszékvezetőnknek Dr. Toldi József egyetemi tanárnak és Dr. Varga Csaba egyetemi docensnek, akik helyet biztosítottak számomra az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken.

Köszönöm egykori és jelenlegi munkatársaimnak, Almási Nikolettának, Amin Al-Awarnak, Börzsei Denise-nek, Csonka Anettnek, Daruka Lejlának, Dr. Deim Zoltánnak, Dr. Hegyköziné Veszelka Médeának, †Dr. László Ferencnek, Dr. Molnár Andornak, Dr. Szalai Zitának, Dr. Szűcs Gergőnek, Karcsúné Dr. Kis Gyöngyinek, Kedvesné Dr. Kupai Krisztinának, Magyari Ferencnek, Magyariné Berkó Anikónak, Prof. Dr. László Ferencnek és Török Szilviának a kísérletekben nyújtott segítségükért, hasznos tanácsaikért.

Köszönöm Niksic-Juhász Katalinnak és Veketyné Váradi Margitnak a sok adminisztrációs segítséget.

Nagyon hálás vagyok a családomnak és barátaimnak, akik mindvégig támogattak és biztattak tanulmányaim során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi munkatársának a barátságos légkört.

A kísérletek elvégzéséhez az alábbi pályázatok nyújtottak támogatást: ÚNKP-ÚNKP-16-3 (Szabó Renáta), ÚNKP-ÚNKP-16-4 (Pósa Anikó), GINOP-2.3.2-15-2016-00062, UNKP-17-3 (Szabó Renáta), UNKP-17-4 (Pósa Anikó) és EFOP-3.6.1-16-2016-00008.

14. Tudományos közlemények listája

Szabó Renáta MTMT azonosító: 10038382

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Pósa A*, **Szabó R***, Csonka A, Veszelka M, Magyariné Berkó A, Baráth Z, Ménesi R, Pávó I, Gyöngyösi M, László F, Kupai K, Varga C:
Endogenous estrogen-mediated heme oxygenase regulation in experimental menopause, *Oxid Med Cell Longev*, 2015;2015:429713., doi: 10.1155/2015/429713.
megosztott elsőszerzőség
IF: 4,593

Pósa A, **Szabó R**, Kupai K, Csonka A, Szalai Z, Veszelka M, Török S, Daruka L, Varga C: ***Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats***, *Oxid Med Cell Longev*, 2015;2015:787063., doi: 10.1155/2015/787063.
IF: 4,593

Egyéb közlemények:

Pósa A, **Szabó R**, Kupai K, Berkó AM, Veszelka M, Szűcs G, Börzsei D, Gyöngyösi M, Pávó I, Deim Z, Szilvássy Z, Juhász B, Varga C:
Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat, *Oxid Med Cell Longev,* 2017;2017:2176749. doi: 10.1155/2017/2176749
IF: 4,593

Gálfi M, Radács M, Molnár Z, Budai I, Tóth G, Pósa A, Kupai K, Szalai Z, **Szabó R**, Molnár HA, Gardi J, László FA, Varga C:
Ghrelin-Induced Enhancement of Vasopressin and Oxytocin Secretion in Rat Neurohypophyseal Cell Cultures, *J Mol Neurosci,* 2016, Dec;60(4):525-530, DOI: 10.1007/s12031-016-0850-4
IF: 2,229

Pósa A*, **Szabó R***, Szalai Z, Kupai K, Deim Z, Murlasits Z, Bencsik O, Szekeres A, Vágvölgyi C, Balogh L, Juhász B, Szilvássy Z, Varga C:
The effect of acute ophiobolin A treatment on HO-mediated inflammatory processes, *Hum Exp Toxicol, 2016,* DOI: 10.1177/0960327116658107
megosztott elsőszerzőség
IF: 1,802

Kupai K, **Szabó R**, Veszelka M, Awar AA, Török S, Csonka A, Baráth Z, Pósa A, Varga C:
Consequences of exercising on ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts: role of the HO/NOS system., *Diabetol Metab Syndr*. 2015 Oct 6;7:85. doi: 10.1186/s13098-015-0080-x.
IF: 2.347

Pósa A*, **Szabó R***, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka A, Veszelka M, Gyöngyösi M, Radák Z, Ménesi R, Pávó I, Magyariné Berkó A, Varga C:
Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2, *Oxid Med Cell Longev*, 2015;2015:876805., doi: 10.1155/2015/876805.
megosztott elsőszerzőség
IF: 4,593

Pósa A, Kupai K, Ménesi R, Szalai Z, **Szabó R**, Pintér Z, Pálfi G, Gyöngyösi M, Berkó A, Pávó I, Varga C:
Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase, *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:521563., doi: 10.1155/2013/521563.
IF: 4,593

Szalai Z, Szász A, Nagy I, Puskás LG, Kupai K, Király A, Berkó AM, Pósa A, Strifler G, Baráth Z, Nagy LI, **Szabó R**, Pávó I, Murlasits Z, Gyöngyösi M, Varga C:

Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/MPO/HO system. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:925981., doi: 10.1155/2014/925981.

IF: 4,593