

Válasz Prof. Dr. Ábrahám István bírálatára

Tisztelettel köszönöm Professzor Úrnak, hogy vállalta dolgozatom bírálatát és alkalmasnak találta a nyilvános vitára.

Kérdéseire válaszaim a következők:

1. *A kémiai ovariectómiával kapcsolatban két kérdés merül fel. Mi volt az oka annak, hogy az ovariectomia mellett ezt is alkalmazták? Hogyan csökkent az ösztradiol szint és mi történik a patkányok ösztrusz ciklusával a triptorelin kezelés után?*

Köszönöm professzor úrnak, hogy felhívta a figyelmemet a 4-vinylcyclohexene diepoxid (VCD) modellre. A VCD-t a kétezres évek elejétől használták menopauza / korai petefészek kimerülés modellként (1, 2), ezt megelőzően, kísérleteink tervezési fázisában, illetve korai kísérleteink idején (1995-1997 között) mint ovotoxikus anyagot tartották számon és petefészek daganatkeltő hatása volt még ismert (3, 4), ezért került látóterünkön kívül. A kilencvenes évek végétől már csak a sebészi oophorectomia modellt használtuk (1998-tól kezdődően), így ezt követően már ezért nem kerestünk alternatív kémiai modelleket.

Jelenleg a szakirodalom a legjobb tranzicionális menopauza modellnek a VCD-t tartja mind korai petefészek kimerülés, mint perimenopauza-menopauza esetében a hormonális átmenet, a tranzíció tanulmányozására (5), mivel akcelerált follicularis depléciót okoz, bár néhány kételyt is megfogalmaznak, miszerint legalább 15 széria intraperitoneális injekció fokozhatja az állatok stressz szintjét, az injekció sorozat idején az állatok fogynak – míg menopauzában a hormonhiány következtében hízás tapasztalható, illetve a sorozatos injekciókkal viszonylag nagy adag VCD-t alkalmaznak, ami fajlagosan viszonylag magas költségű kezelés (illetve az egyéb szervek károsodása sem zárható ki, mivel nagyobb adagban illetve hosszabb idő alatt hepato- és nephrotoxikus (6) illetve bizonyos petefészek- és bórdaganatokat okozhat (7), ez a gumiparból ismert anyag), így a menopauza modellek szempontjából jelenleg is a „gold standardnak” a sebészi menopauzát tartják (5) mely olcsó, költségghatékony és jól modellezi az ösztrogénhiány következményeit.

Bár a tranzíció, az átmenet tanulmányozására a legjobb modell a VCD, kísérleteink során egyszerűbb gondolatmenettel munkacsoportunk eredetileg a rövid-krónikus hormonhiányban kialakuló első elváltozások, érkárosodások vizsgálatát tűzte ki célul. Azaz nem a fokozatosan kialakuló hormonhiány, hanem a rövid krónikus hormonhiány vizsgálata volt a célunk, a kialakulás dinamikájától függetlenül.

Munkacsoportunk az ovariectomia korábbi modelljeként alkalmazta a triptorelin injekciót, melyet a klinikai gyakorlatban a terápia rezisztens endometriosis kezelésére alkalmazunk 3 illetve maximum 6 hónapig, mint művi menopauzát időszakosan előidéző készítményt. A modellt Ács Nándor professzor úr állította be PhD munkája során, így az Ő munkájának a folytatásaként vettem át, – így ez a választás a klinikum irányából érkezett, mint terápiásan a betegellátásban is alkalmazott „menopauza modell”. A triptorelin humán és állatkísérletes körülmények között is leállítja a ciklust és a kezelés idejére anovulációt okoz, az élettani menopauza másik jellemzőjeként ismert GNRH pulzatilitást szünteti meg és szupprimálja, így okoz művi menopauzát és kísérleteinkben is szupprimált ösztradiol és progeszteron szinteket eredményezett:

Kontrollok: 26.9 ± 3.6 pg/mL; ovariectomizált állatok (OVX): 7.4 ± 2.1 pg/mL (OVX+ ösztradiol pótlás): 28.4 ± 3.4 pg/mL; (OVX+ progeszteron pótlás): 8.1 ± 2.2 pg/ml és (OVX+ ösztrogén + progeszteron pótlás) 27.4 ± 3.3 pg/ml.

A progeszteron-szerű immun-kémiai aktivitás kontrollokban: 21.5 ± 3.9 ng/ml, OVX: 7.9 ± 1.3 , OVX+P: 20.7 ± 4.5 , illetve OVX+E+P: 19.8 ± 4.3 ng/ml. Az egyes hormonpótlások a kontrollal

azonos, a triptorelin kezelés szignifikánsan és jelentősen alacsonyabb hormonszinteket eredményezett (8, 9). Emellett a 3 hónapos kezelés során havi egy injekcióban részesültek az állatok, így az ebből adódó stressz is mérsékelt volt.

A triptorelin kezelés során 4 hetente egy injekciót alkalmaztunk (összesen három alkalommal), hatása átmeneti, reverzibilis, a klinikai tapasztalatok alapján a kezelés elhagyását követően visszaáll a normál ciklus. Toxikus hatás nem ismert alkalmazásakor – a 6 hónapos felső korlát a klinikumban a menopauzális osteoporózis kialakulásának megelőzésére szolgál.

Az akkori kutatási kereteinkhez mérten viszonylag drága készítményt egy ideig a cég adományaként kaptuk, majd ezt követően álltam át, szintén Ács professzor úr metodikai segítségével a sebészi oophorectomia invazív, de költséghatékonyabb modelljére, melyre a szakirodalom húsz év után, jelenleg is „gold standard”-ként tekint (5).

2. *Az állatkísérletek koncepciója (20. oldal 1. táblázat) több esetben nélkülözi a kísérleti elrendezések szimmetriáját. Például nem igazán érthető, hogy intakt nőstény és hím patkányoknál vizsgálták a normotóniás és a hipertóniás állapotot, ugyanakkor a hiperandrogén modellekben ezt miért nem tették meg? Ugyancsak nehezen érthető, hogy menopauza modellekben normalis vérnyomásnál a véna saphenát, az artéria saphenát és az arteria coronariát vizsgálat alá vonták, azonban az ATII indukált hipertenzióval kapcsolatos kísérletekben csak a véna saphenára terjed ki a vizsgálat.*

Munkacsoportunk állatkísérletes modelljei a disszertációban és azon kívül:

1. táblázat: Az állatkísérletes modellek összefoglalása.

Modell típusa	Normotónia	Hipertónia
Nemi különbségek	1A	1B
Kardiovaszkuláris veszélyeztetettség fertilis korban	Hiperandrogén modell + D vitamin kezelés védő hatása (2A)	A modell alapját képező DHT pellet 2015 óta az USA-n és Kanadán kívül nem elérhető
	Hiperandrogén állapot + D-vitamin hiány közös károsító hatása (2B) – e téma eredményeinek publikációja most is folyamatban van*	jövőben tervezett vizsgálat
Menopauza modellek	Sebészi és farmakológiai ovariectómia (3A1, 3A2)	hipertónia + sebészi ovariectómia (3B)

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

Ér-típus	Normális vérnyomás	ATII hipertónia
vena saphena	K / OV/ OV+komb HPK	OV/ OV+ATII/ OV+ATII+k.HPK
arteria saphena	OV/ OV+E – akut E (Kakucs) Ács és mtsai BJOG 1999, Maturitas 2000	Várbíró és mtsai J Hypertension, 2000 (PhD munkámban)
arteria coronaria (LAD)**	K/OV/OV+komb HPK	Mátrai M et al, Menopause, 2016

* Hadjadj et al, Microvasc Res 2019, Gynecol Endocrinol 2019, Lajtai et al, Biomolecules 2019, Sziva et al, Antioxidants 2020. Még 5 kézirat készül jelenleg: publikációra elküldve / írása folyamatban van a témában.

** Andropauza / andropauzális hipertónia modellben is megjelent az első publikációnk: Jósmai et al, J Sex Med 2020, a második publikációra elküldve (Andrology) – itt egyelőre hormonpótlás nélkül.

A hiányolt közleményeinket részben csak citálni tudtam, mivel ezek alkották Ács Nándor professzor úr, Kakucs Réka doktornő és saját PhD értekezéseink alapját, így az eredményekben a PhD védésemet megelőző közleményeket nem szerepeltethettem. Ács professzor úr témája a menopauza-hormonpótlás modellben a különböző hormonpótlási sémák hatása volt arteria saphenán. A vena saphenára vonatkozó normotóniás eredményeinket, ATII hipertóniás artériás eredményeinkkel együtt saját PhD értekezésemben ismertettem. Dr. Kakucs Réka PhD-ja az akut ösztrogén hatás vizsgálatára vonatkozott – e munka utolsó elemét az akut ösztadiol hatás vizsgálatát krónikus hormonhiányban, már szerepeltettem MTA doktori értekezésemben, mivel ez PhD védésemet követően végzett munkánk volt, és koncepciójában illeszkedett a témához. Mátrai doktorral közös munkánk nem szerepel a dolgozatban, mert jelenleg írja PhD dolgozatát a témakörben.

Összességében először Székács professzor úr témavezetésével, majd ezt követően önálló pályafutásom során vizsgáltuk normo és hipertóniában az intakt viszonyokat, a menopauza és a hormonpótlás, illetve az andropauza állapotát – egyelőre andropauzális hormonpótlással nőgyógyászként még nem foglalkoztam. Ezekben a korai években a nemi különbségek, illetve a hormonhiány-hormonpótlás keringéssélettani hatásait vizsgáltuk.

A PCOS modellekben napjainkban más konstrukciókat alkalmaztunk, kicsit eltérő kérdésfelvetéssel. A hiperandrogén modellek önmagukban az általunk alkalmazottnál kicsit hosszabb kezeléssel már hipertóniát okoznak. Ebben a vonatkozásban párhuzamba állíthatóak az ATII kezeléssel, mivel ott szubpresszor dózist alkalmazva éppen kialakult hipertónia (kb 3 hét után, mi 4 hetes kezelést alkalmaztunk), addig a PCOS modellekben még éppen nem alakult ki hipertónia: DHT kezelés esetén 10 hetes sémát alkalmaztunk, 12 hetes már hipertóniát okozott volna, míg tesztoszteron esetén 8 hetes kezelést, ott 10 hét után alakult volna ki hipertónia.

Hipertóniás vizsgálatokat munkacsoportunk előtt már közöltek (10, 11), erről viszonylag részletesebb tudásunk volt – de nem volt egyértelmű, mi a hiperandrogén állapot és mi a hipertónia következménye, melyek a kezdeti károsodások és hogyan hat a D-vitamin illetve annak hiánya ezekre az elváltozásokra. E kombinált modellben az első vizsgálatoknál a hiperandrogén állapot és a D-vitamin hatás mellé harmadik ismeretlenként nem akartam bevonni a vizsgálatba a hipertóniát. Most publikáljuk normotóniás eredményeinket, a hipertónia vizsgálata ezt követően kerülhet majd sorra.

Míg önmagában az ovariectomia / orchidectomia nem változtat a kísérleti állatok vérnyomásán, ezért az ATII kezelés a kardiovaszkulárisan sérülékenyebb, kezdeti hipertóniás állapot modellezésére szolgált, addig erre DHT és tesztoszteron kezelés esetén nem volt

szükségünk, mert az alap androgén kezelés is prehipertenzív állapotot hozott létre, amint ezt később eredményeink is igazolták. Ott a rövidebb kezeléseket azért alkalmaztuk, hogy az androgén hatás egyértelműen elkülöníthető legyen a magasvérnyomás okozta károsító hatásoktól, mint ezt a hosszabb modellekben biztosan elkülöníteni nem lehetett volna. A jövőben felmerül a hosszabb tesztoszteron kezelési sémával kiváltott hipertónia, mint komorbiditás vizsgálata is, a kezdeti károsodásokat követően a következő, középsúlyos eltérések tanulmányozására. A disszertációmban ismertetett munka remélem nem zárul le, hanem ebben az irányban is folytatódik.

3. *Az immunhisztokémiai protokollok leírása a metodikában nagyon hiányos, például: insulin receptor, D-vitamin receptor, e-NOS, PAR, COX-2 nitrotirozin immunhisztokémia. Mekkora volt a metszet vastagság, milyen szekunder antitesteket és detekciós protokollokat használtak ezeknél az immunhisztokémiai festéseknél?*

A metszetek vastagsága 5-7 mikrométer volt. A leírások az immunhisztokémiai protokollokkal kapcsolatosan a disszertációból, illetve részletesebben a cikkek alapján:

eNOS, COX-2, nitrotirozin

A COX-2 és az eNOS antitesteket az Abcam (Cambridge, UK); a szekunder antitesteket, normál kecske szérumot, az avidin-biotinilált enzim komplex kítet és a DAB-ot a Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) cégen keresztül szereztük be. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a gyártók protokolljai szerint végeztük. Részletesebben Masszi és mtsai Life Sciences publikációja alapján (12):

Az ovariumokat és aorta ringeket a kivétel napján 4%-os formaldehidben fixáltuk a szövettani vizsgálatok céljából. Vénás vérből leukocitákat gyűjtöttünk Histopaque-1083 (Sigma Aldrich) alkalmazásával. A petefészkeket haematoxin-eosin festéssel festettük meg, hogy a PCOS szövettani jegyeit fénymikroszkóppal detektálhassuk. A paraffinba ágyazott aorta és ovarium metszeteket – deparaffinizáció és antigén feltárás után (0,1 mmol/l citrát puffer, pH 3, mikrohullámmal 15 percig melegítve) – immunhisztokémiai festésnek vetettük alá. Nitrotirozin immunhisztokémiai festést (poliklonális nyúl anti-nitrotirozin antitest, 1:200 arányban, egy éjszakán át, 4 °C-on, Millipore, Billerica, MA, USA); endoteliális NO szintáz immunhisztokémiai festést (poliklonális nyúl anti-eNOS antitest, 1:06 arányban, 70 percig, 37 °C-on, Abcam, Cambridge, MA., USA) és ciklooxygenáz 2 immunhisztokémiai festést (poliklonális nyúl antiCOX2 antitest, 1:200 arányban, 70 percig, 37 °C-on, Abcam, Cambridge, MA. US) alkalmaztunk. A másodlagos jelölést biotinilált nyúl ellenes kecske antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) értük el szobahőmérsékleten 30 perc inkubációs idővel. A jelölés vizualizálására torma peroxidázzal conjugált avidint adtunk hozzá (30 percig, szobahőmérsékleten), valamint nikkellel felerősített diaminobenzidint (DAB, szobahőmérsékleten, 6 percen át, fekete szín) alkalmaztunk. A metszetek és kenetek esetén nuclear fast red-et alkalmaztunk a sejtmagok láthatóvá tételére (Nuclear Fast Red (NFR, Sigma Aldrich). A festett metszetekről mikroszkópos képeket készítettünk a Zeiss Axio Imager rendszerrel (Zeiss AxioImager.A1 és Zeiss AxioCam MRc5 CCD kamera). A festések intenzitását MBF ImageJ szoftverrel határoztuk meg (McMaster Biophotonics Facility, Ontario, Canada). Nitrotirozin esetében a pozitívan festődött szöveti terület arányát számoltuk ki a teljes területhez képest. Az eNOS és a COX-2 antitestek esetén az aorták endoteliális rétegét értékeltük. A keringő leukociták nitrotirozin pozitivitását egy független vizsgáló, vakon, 1-től 10-ig relatív skálán értékelte a festett keneten.

PAR

A PARP aktivitás a sejtszintű DNS-károsodás markere, PAR-antitesttel végzett immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a kontroll állatok különböző szöveteiben – keringő leukociták, ovariumok, endothel, vaszkuláris simaizom sejtek - ugyanolyan PAR-festődést találtunk.

A részletes festési protokoll Masszi és mtsai Plos One publikációja alapján (13):

Petefészkeket és az aorta gyűrűket a kísérlet napján frissen 4%-os formadehidben fixáltuk szövettani vizsgálatokra. Hematoxin-eosin festés alkalmaztunk és a szövettani képeket a Zeiss Axio Imager rendszerrel (Zeiss AxioImager.A1 és Zeiss AxioCam MRc5 CCD kamera, Panoramic viewer szoftver (3DHISTECH Kft, Budapest, Magyarország)) vizsgáltuk. Vénás vérből leukocitákat gyűjtöttünk a Histopaque-1083 (Sigma Aldrich) használatával. Metanol fixált keneteket készítettünk a sejt szuszpenziókból. A formalin fixált aorta és petefészkek mintákat paraffinba ágyaztuk és 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. Deparaffinizáció és antigén feltárás után (0,1 mmol/l citrát puffer, pH 3, 15 perc mikrohullámú melegítés), a mintákat egér monoklonális anti-PAR antitesttel (Calbiochem, San Diego, CA, USA) festettük meg, egy éjén át kezelve, 1:1000 arányban 4 °C-os hőmérsékleten. A másodlagos jelölést biotinilált egér ellenes ló antitesttel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten végeztük. Torma peroxidázzal konjugált avidint adva hozzá (30 percen keresztül, szobahőmérsékleten), valamint nikkellel felerősített diaminobenzidint (DAB, szobahőmérsékleten 6 percen keresztül, fekete szín) használtuk a jelölés vizualizálására (Vector Laboratories). A metszetek és kenetek esetén nuclear fast redet alkalmaztunk a sejtmagok láthatóvá tételére (Nuclear Fast Red (NFR, Sigma Aldrich). A PAR festés értékelésére szemikvantitatív pontozásos skálát alkalmaztunk: a festett keneteken látottakat, független vizsgáló vakon 1-10ig értékelte: 1: nincs festődés, 2: enyhe citoplazmatikus festődés; 3: erős citoplazmatikus festődés; 4: citoplazmatikus festődés néhány pozitív sejtmaggal; 5: a sejtmagok 50%-a pozitív festődésű; 6: a sejtmagok 75%-a pozitív; 7: általános magfestődés néhány negatív sejttel; 8: minden sejtmag pozitív; 9: erős magfestődés minden sejten; 10: igen erős általános magfestődés minden sejten (14). Leukocita kenetek esetén 5 látómezőt, minimum 300 sejtet értékeltünk. Artériák és a petefészkek esetében a teljes szövettani mintát értékeltük.

Inzulin receptor, D-vitamin receptor

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

Az ultraView Universal DAB Detection Kit a Banch/Mark ULTRA automata immunhisztokémiai (IHC)/in situ hibridizáció (ISH) metszetfestő rendszerhez fejlesztett klinikailag diagnosztikához használható detekciós kit, mely tartalmazza mind a másodlagos (feltehetően HRP-konjugált) antitesteket és a DAB szubsztrátot is. A kit-ben található szekunder antitestekről további információ nem elérhető, a termék leírása az alábbi linken található: <http://www.ventanadiscovery.com/product/1414?type=1791>.

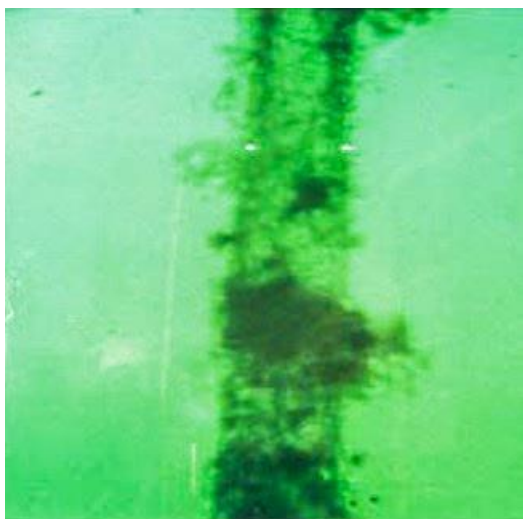
4. *A 29. oldalon az 1. B) ábrán a mikroangiometriás fotó életlenül látszik és hiányzik a kalibrációs egyenes. A 30. oldalon a LAD koronária érrendszer hálózata ugyancsak életlen és nem világos, hogy a nyíl a 6x nagyítású képen mire mutat? Mekkora távolságot reprezentál a kalibrációs egyenes?*

Sajnos ez jogos kritika. A file konverziók során mindig sérül a képek minősége és sajnos nem értek jobban a grafikai programokhoz, hogy ezt ennél jobb minőségben prezentálni tudjam. Ezt csak úgy tudom áthidalni, hogy az eredeti közlemény különlenyomatát elküldöm az újság honlapjáról letöltött pdf-ben.

A kalibrációs lépték valószínűleg másolási hiba miatt maradt le, az emiatt hiányzó adatokat a válaszban megadtam.

A jelzett fotók illusztrációs képek, a metodika jobb megértése céljából (nem mérési eredmény dokumentációja). Remélem, a most csatolt fotó jobb minőségű lesz, a pdf konverzió sajnos rontott a képek, fotók minőségén. A fehér jelző képpontok közötti távolság (az érátmérő) 137 mikrométer.

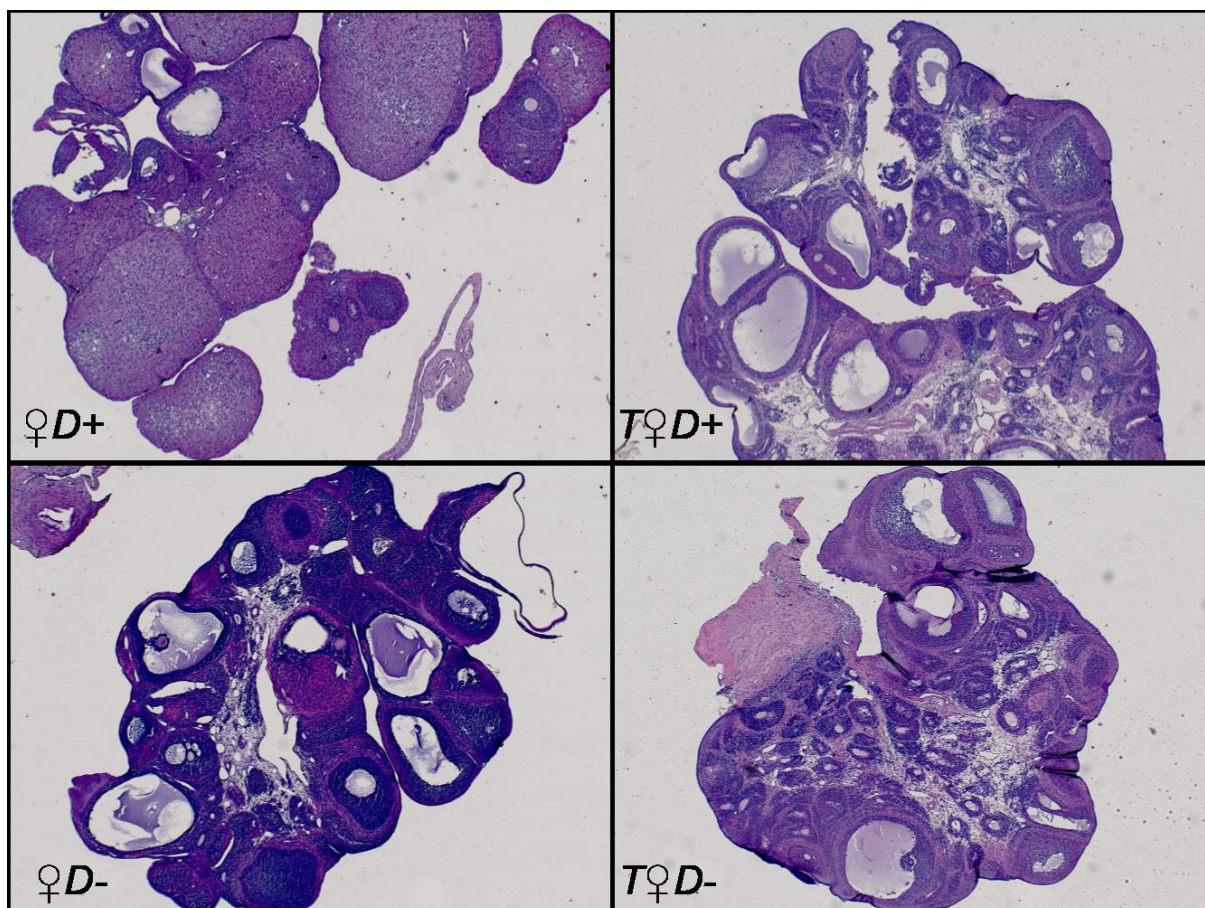
A 30. oldalon a nyíl egy preparációra kerülő LAD koszorúér szakaszt mutat, a felső képen a skála 2 millimétert mutat, az alsó képen 200 mikront.



5. *Miért alkalmaztak kétféle PCOS modellt? A tesztoszteron kezelés végen milyen volt az ovárium hisztológiai képe?*

A modell váltás oka az volt, hogy az USA a korábban alkalmazott DHT pelletet tiltó listára tette, és az USA határain kívül egyedül Kanadában engedélyezték a forgalmazását az Innovative Research of America-nak (ezt a terméket egyedül ők forgalmazták) – ezt követően kerestünk hazánkban is beszerezhető alapanyagokra épülő és ekvivalensnek tűnő modellt – melyet a tesztoszteron kezelés nagyrészt, de nem teljes mértékben beváltott.

Az ovariumok hisztológiai képét tartalmazó cikkünket a disszertáció alapjának lezárását követően publikáltuk (közelítően a disszertáció beadásakor jelent meg a közleményünk), hasonló volt, mint a DHT modellben: Pál Éva és mtsai, 2009 (15).



Petefészek szövettanok

Reprezentatív fotók a hematoxylin-eosin festett petefészekről. A $T♀D+$ és $T♀D-$ állatok petefészkeit a PCOS-re emlékeztető, megnövekedett számú kisméretű primordialis follikulus megjelenése jellemezte.

Illetve egy jelenleg folyamatban lévő kéziratunk alapján részletesebben:

1. táblázat

A napi hüvely kenetvizsgálat alapján azonosított normal ösztroz fázisok száma a kezelés 6. hetétől kezdve, a petefészek végső súlya, tüsző és sárgatest átlagos száma, valamint a teljes petefészek terület arányában a kezelés 8. hetében (minden adat átlag $\pm$ SEM formában van feltüntetve).

	VD+/T-	VD+/T+	VD-/T-	VD-/T+
Ösztroz szám (6-8. kezelési hét) N=11 csoportonként	3,63 $\pm$ 0,15	0,91 $\pm$ 0,21 $\ddagger\ddagger$	2,00 $\pm$ 0,23*	0,36 $\pm$ 0,20 $\ddagger\ddagger$
Petefészek végső súlya (g) N=11 csoportonként	0,25 $\pm$ 0,09	0,06 $\pm$ 0,01*	0,07 $\pm$ 0,01*	0,068 $\pm$ 0,02*
Átlagos tüsző szám N=6 csoportonként	13,66 $\pm$ 1,72	58,50 $\pm$ 1,94 $\ddagger$ *	35,01 $\pm$ 2,68*	71,33 $\pm$ 5,76 $\ddagger\ddagger$
Follikulus terület/teljes	19,27 $\pm$ 1,29	43,99 $\pm$ 1,17 $\ddagger$ *	29,02 $\pm$ 4,49	38,29 $\pm$ 2,56 $\ddagger$

petefészek terület*100 (%) N=6 csoportonként				
Átlagos sárgatest szám N=6 csoportonként	12,67± 1,85	0,83± 0,40†*	5,16± 1,22	1,16± 0,40†*
Sárgatest terület/teljes petefészek terület*100 (%) N=6 csoportonként	48,12± 3,19	0,68± 0,26‡†	11,56± 3,26†	0,82± 0,27‡†

A D-vitaminnal szupplementált, tesztoszteronnal nem kezelt állatok rendszeres és szabályos ösztrusz mintázattal rendelkeztek és szignifikánsan magasabb volt az ovulációs rátájuk a tesztoszteronnal kezelt csoporthoz képest (‡ p<0,001). A D-vitamin hiányos, transzdermális tesztoszteron mentes állatok szintén szignifikánsan kevesebb ösztrusz ciklussal jellemezhetők, mint megfelelő D-vitaminos párjuk (* p<0,05), de szignifikánsan többel, mint a tesztoszteron kezelt csoportok († p<0,01). A végső petefészek súlyát tekintve mind a három csoport szignifikánsan alacsonyabb eredményeket ért el, a D-vitaminnal kiegészített, tesztoszteronnal nem kezelt csoporthoz képest (* p<0,05). Az átlagos follikulus szám és azok terület aránya a teljes petefészekhez képest szignifikánsan magasabb volt a tesztoszteronnal kezelt állatokban a D-vitamin kezelt (‡ p<0,001 és † p<0,01) és D-vitamin hiányos állatokhoz képest († p<0,01 és * p<0,05). D-vitamin hiány önmagában magasabb számokat eredményezett (* p<0,05). A tesztoszteronnal kezelt csoportokban szignifikánsan alacsonyabb számú sárgatestet találtunk a megfelelő csoportokkal összehasonlítva († p<0,01 and * p<0,05). Ezek a változások a teljes petefészek arányában is megfigyelhetők voltak. VD+/T-: D-vitamin pótolta, transzdermális tesztoszteron mentes; VD+/T+: D-vitamin pótolta és transzdermális tesztoszteron kezelt; VD-/T-: D-vitamin hiányos és transzdermális tesztoszteron mentes; VD-/T+: D-vitamin hiányos és transzdermális tesztoszteron kezelt. One-way ANOVA, Tukey post hoc teszttel.

6. *A nemi különbségek vizsgálatánál nem világos, hogy a nőstény patkányok az ösztrusz ciklus melyik szakaszában voltak (pl. kontraktilitás vizsgálat)? Hogyan befolyásolhatja ez az eredményeket?*

Nem vizsgáltuk ebben az anyagban az ösztrusz ciklus változásait, csak a PCOS modellekben, a PCOS-ben jelentkező ciklus-zavar igazolására.

Ennek megfelelően az irodalmi adatok alapján egészséges kontrollok esetében a csoportok szórását növeli, ha különböző ciklusszakban lévő állatokat vizsgálunk.

A bírálók azért nem kifogásolták ezt az eljárást, mert konvencionálisan a nemi különbségek vizsgálatát random ciklusszakban lévő patkányokkal végezzük tekintettel arra, hogy a vizsgálat kérdése nem a ciklusfüggő hanem a nemi különbségek vizsgálata volt. Amennyiben ciklusban rögzített időpontban végeztük volna a vizsgálatainkat, akkor nem tudtunk volna általános nemi különbségekre következtetni, hanem csak a proösztrusz / ösztrusz/ metösztrusz/ diösztrusz és a hímek közötti különbségeket értékelhettük volna. Emellett a kísérletek tervezése is nehezített, mivel az első két ciklusszak kb 12 órás időtartamú, így ebben az esetben bizonyos vizsgálatokat éjszaka kellett volna elvégeznünk, ha a ciklushoz igazodunk, beleértve a komplett 6-8 órás keringéselettani vizsgálatot is, ami nehezítette volna a labormunka összehangolását is, ugyanakkor csökkentette volna vizsgálataink értékét annak

okán, hogy nem általánosan a nemi különbségek, hanem az egy adott ciklusszak és a hímek közötti különbséget jellemezte volna csak.

Összességében a női ciklus és a vaszkuláris változások összefüggéseiről:

Vaszkulárisan sérülékeny állapotban, mivel a menstruatio alatt a legalacsonyabb az ösztadiol szint, részben ezzel hozzák összefüggésbe, hogy a fertilis korú nőkben ilyenkor a legnagyobb az esélye a coronaria eseményeknek (16) és a stroke-nak (17). Előbbi a menstruatio alatt megnövekedett endothelin szint (16), utóbbi a fokozott szerotonin érzékenység következménye is lehet (18). Mindkettő esetében a vazokonstriktor reaktivitás nő. A progeszteron simaizom relaxáns hatása is ismert (19), ennek megfelelően a luteális fázisban a vazorelaxáció növekedését és a vazokonstriktó csökkenését várhatjuk – ez egészségekben inkább tendenciaszerű, mint markáns különbség – a férfiakhoz viszonyított nemi különbség jellemzően a ciklusszaktól függetlenül megtartott (20). Rakobowchuk és mtsai. nem talált különbséget a vaszkuláris reaktivásban egészséges fiatalokban (21). Ugyanakkor beszámoltak vazokonstriktor érzékenység csökkenésről is a korai lutealis fázisban a korai follicularishoz képest (22).

Egészséges fiatalokban nincs számottevő, kimutatható hatása a ciklusnak a célszervi keringésre (20, 23), de kardiovaszkulárisan sérülékeny állapotban már kimutatható a kardiovaszkuláris események rizikójának ciklusfüggő fokozódása (16, 17).

Állatkísérletes vizsgálatokban is találtak ciklusfüggő különbségeket. Mesenterialis artériákon az angiotensin 1-7-függő vazorelaxáció proösztuszban nagyobb volt, mint diösztuszban (24). Míg Lucca és mtsai. (25) a vazokonstriktó mértékét találta kisebbnek proösztuszban mint ösztuszban és diösztuszban, míg az acetilkolinfüggő relaxációban abszolút értékben nem talált különbséget, csak a háttér-mechanizmusok dominanciájában (eNOS upregulációt írt le proösztuszban).

Összességében Cairrao és mtsai ösztadiol és progeszteron hatására is vazorelaxációt írtak le, tehát ezen hormonok emelkedése inkább a relaxáció, míg alacsonyabb szintje a vazokonstriktó irányába tolja az érválaszokat (26).

Részletesebben a ciklusfüggő hatásokat az alábbi táblázat foglalja össze (27):

Vasoactive Substance	Model	Tissue	Actions in Endothelium	References
Norepinephrine (NE)	Control group: Cyclic rats Experimental group: Ovariectomized rats (OVX)	Aorta (vascular smooth muscle) Treated in isometric myography system	-The vascular synthesis of both PGE2 and PGF2a was significantly higher in the group of OVX rats compared to the proestrous. -The vascular response to NE was significantly higher in OVX rats, compared to normal cycling rats during proestrous.	(28)
Cirazoline (α 1-Adrenergic agonist)	Pregnant, proestrous and diestrous rats	Mesenteric vascular bed Treated by perfusion	-The tone induced by cirazoline was lower in the proestrous and pregnant groups, but the increase in the tone of L-NA is higher in pregnant compared to proestrous and diestrous group. The participation of EDRF in this effect is suggested.	(25)
Methacholine	Control group:	Uterine and	-The relaxation induced by	(29)

(Muscarinic agonist, endothelium-dependent vasodilator)	Experimental group: Pregnant mice	mesenteric arteries Treated in isometric myography system	methacholine was higher in pregnant mice, in both uterine artery and mesenteric vessels, with a more pronounced effect on the uterine vasculature. -Modulation of relaxation is endothelium-dependent PGHS or NOS pathways is reinforced in the uterine arteries.	
Aspilia africana (Ethanolic extract)	Cyclic rats	Uterine endothelium Treatment by using an oropharyngeal cannula and calibrated hypodermic syringe	-Dose-dependent decrease in duration of estrous cycle and histoarchitecture of the uterus.	(30)
Buddleja globosa (Ethanolic extract)	Cyclic rats Ovariectomized rats (OVX)	Uterine endothelium Treatment administered subcutaneously with hypodermic syringe	Anti-estrogenic effect of extract of Buddleja globosa at the highest dose evaluated.	(31)

7. *A statisztikai vizsgálatoknál legalább az ábra feliratokban jó lett volna feltüntetni az adott csoport elemszámát. Az ANOVA-nál milyen volt az adatok eloszlása kísérletenként és milyen eredményt adott a varianciák homogenitása?*

A metodikában az esetszámokat megadtam – kétségkívül áttekinthetőbb lett volna ezt minden ábra aláírásban jelezni.

Az adatok Gauss szerinti eloszlását D'Agostino & Pearson teszt elvégzésével ellenőriztük. Az ANOVA során F-próbát, Brown-Forsythe, és Bartlett's tesztet végeztünk ez esetlegesen elérő csoport varianciák ellenőrzésére, ha ennek eredménye nem volt szignifikáns, akkor értelmeztük a ANOVA és főként Tukey, illetve Bonferroni post hoc tesztek eredményeit. Ha a fenti próbák eredménye alapján az ANOVA nem volt elvégezhető, akkor Wilcoxon féle rank korrelációt vagy Kruskal Wallis tesztet használtunk.

8. *A 19. ábra és a szövegben megadott adatok alapján a follikulus átmérők meghatározása nehezen értelmezhető. Pontosán milyen metodikával határozták meg a follikulosok méretét és hogy számolták az átlagot?*

A szövettani értékelést hematoxilin eozin festett metszeteken Pannoramic Viewer szoftver (3DHitech Magyarország) segítségével végeztük, a méréseket relatív egységben (pixelben) adtuk meg (32). Minden állat / ovarium esetében 5 metszet teljes keresztmetszetébe eső összes folliculust és teljes felszínt lemértük.

9. *A 40. ábrán lévő e-NOS adatokat hogyan kapták meg? Hogyan kvantifikálták az e-NOS immunhisztokémiát (pl. mely területekről, mekkora ROI stb.)?*

Az eNOS-sal pozitívan festődő endotél területét a teljes endotél terület százalékában adtuk meg. Nem volt szűkebb ROI kijelölés, a teljes endotél festődését határoztuk meg és az endotél teljes felszínének százalékában adtuk meg.

10. A 7. táblázatban lévő PAR immunhisztokémia képei nagyon kis méretűek és a nagy nagyítású inzertek hiányoznak. Mit jelent „a PAR szintek” kifejezés az y tengelyen a 42. és 43. ábrán? Hogyan kvantifikálták?

Korai vizsgálatainkban tapasztalt vizsgáló 1-10 skálán szemikvantitívan, vakon pontozta a metszeteket. Ennek részletes elemzése a 3. kérdésre adott válasznak megfelelően:

A PAR festés értékelésére szemikvantitatív pontozásos skálát alkalmaztunk: a festett keneteken látottakat, független vizsgáló vakon 1-10ig értékelte: 1: nincs festődés, 2: enyhe citoplazmatikus festődés; 3: erős citoplazmatikus festődés; 4: citoplazmatikus festődés néhány pozitív sejtmaggal; 5: a sejtmagok 50%-a pozitív festődésű; 6: a sejtmagok 75%-a pozitív; 7: általános magfestődés néhány negatív sejttel; 8: minden sejtmag pozitív; 9: erős magfestődés minden sejttben; 10: igen erős általános magfestődés minden sejttben (14). Leukocita kenetek esetén 5 látómezőt, minimum 300 sejtet értékeltünk. Artériák és a petefészkek esetében a teljes szövettani mintát értékeltük.

11. Generálisan megkérdezhető, hogy miért nem használtak western blot-ot az expressziós szintek vizsgálatánál (eNOS, PAR, COX-2 stb.)?

Az eNOS és a COX-2 vonatkozásában egyrészt elvesztettük volna az endotél lokalizáció vizsgálati lehetőségét, másrészt nagyon kicsi volt az érszövet tömege, így western blot-ra nem lett volna elegendő. PAR esetében az érszövet esetében nem, csak az ovarium esetében lett volna elegendő minta western blot elvégzésére, de a lokalizációt szintén elveszítettük volna, ezért az összehasonlíthatóság érdekében maradtunk az immunhisztokémiás vizsgálatnál – mely az abszolút mennyiségek kimutatására ugyan nem alkalmas, de relatív arányokat és lokalizációkat tudtunk követni vele.

12. A 9. táblázatban lévő képeken nem látható a COX-2 expresszió. 10. táblázatban a szövettani képek túl lettek exponálva a nagy nagyítás miatt nem igazán látszik, hogy mi tekinthető immunpozitív jelnek. A 9. és 10. táblázat COX-2 immunhisztokémiai képe redundáns.

Sajnos ezek a részek is az elektronikus képszerkesztés és a pdf konverzió áldozatául estek – leszámítva az eredetileg is túl exponált szövettanokat. A 9. ábra rezorcín festést ábrázol. Alatta a szöveges rész már a 10. ábra COX-2 eredményeit ismerteti; a dolgozat tördelésénél nem vettem észre, hogy ez külön oldalra került a 10. ábrától – ez okozhatta a félreérthető helyzetet.

13. A 77. és 78. ábrán az x tengelyen pontosan mekkora koncentrációk lettek feltüntetve az ösztradiol és a nifedipin tekintetében?

1, 10, 20, 50 és 100 mikromól/l dózisokat teszteltünk, illetve nifedipin esetében 0,1 és 0,01 mikromólos koncentrációt is. 1 mikromólos koncentráció alatt értékelhető relaxáns választ nem kaptunk egyik farmakon esetében sem.

14. A 99. oldalon leírtak szerint az akut kezelésekben 1, 10, 100 μ M ösztradiol koncentrációt alkalmaztak, ami nagyságrendekkel nagyobb, mint a farmakológiai dózis. Miért?

Izolált ereken az „ér-ág” hiányában, környezetükből kiemelve az erek reaktivitása csökken, ezért ezek a szokásos dózisok. Hasonló adagokat alkalmaztunk nifedipinből is, mely in vivo jóval kisebb koncentrációban is hatékony, hasonlóan az ösztadiolhoz. Teszteltük, de kisebb koncentrációkban relaxáns hatást nem tapasztaltunk.

15. A 68-71. ábra mutatja az D vitamin és az inzulin receptor expressziós szint változásokat. Hogyan nyerték ezeket az adatokat? Mivel nincs jó minőségű fotó az immunhisztokémiai expressziós mintázatról ez az adat még nehezebben értelmezhető.

Ennél az immunhisztokémiai festés sorozatnál valóban kimaradtak a demonstratív fotók, furcsa módon az újság redundáns adatként értékelte és ezért ki kellett hagynunk a kéziratból, így a publikált anyagban már nem szerepeltek, ezért a disszertációba sem kerültek be – csak a statisztikailag kiértékelt eredmények grafikonjai.

Az adatokat (pozitívan festődő coronaria endotél illetve media felszín) a teljes endotél illetve media érfelszín terület százalékában adtuk meg.

Reprezentatív fotók, ábrák és ábraalírások az eredeti kéziratból, melyeket végül ki kellett hagynunk:

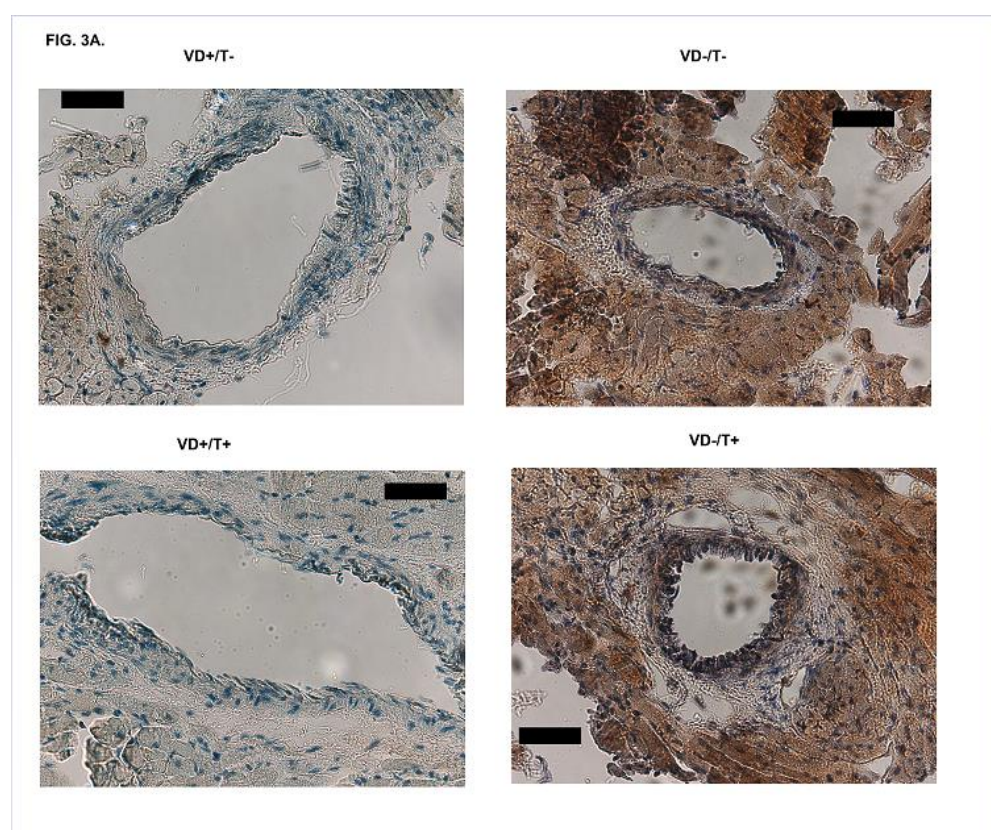


Fig. 3A. Insulin receptor (IR) expression in coronary arterioles after 8 weeks of transdermal treatment with testosterone and VitD deficiency.

A jelzések 20 mikrométeres távolságot jelölnek.

Fig. 3B

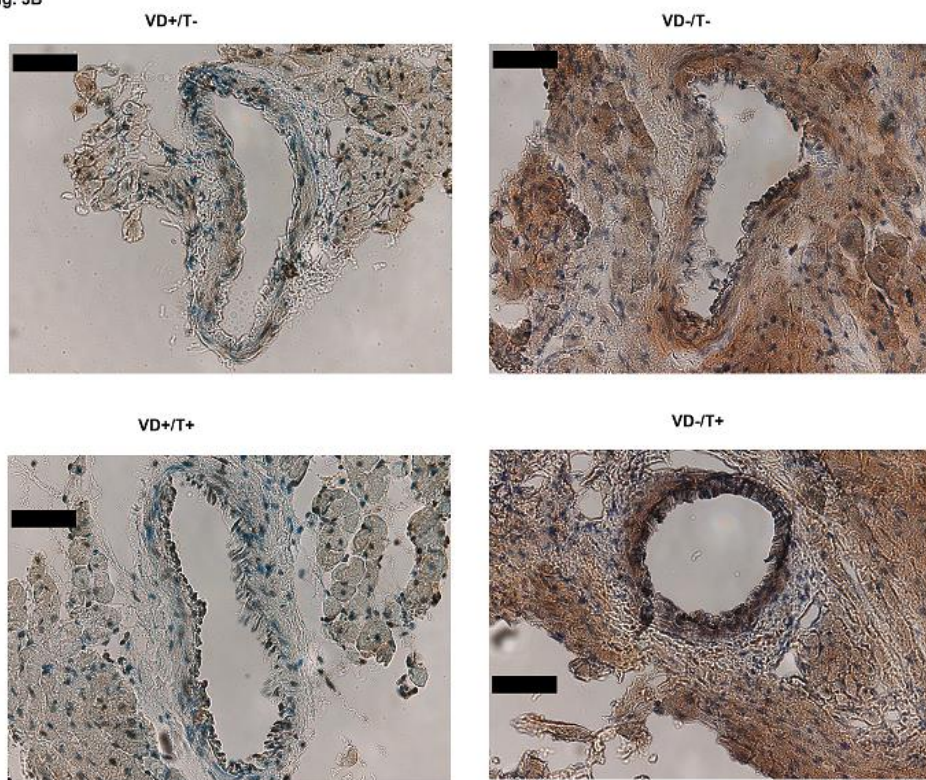


Fig. 3B. VitD receptor (VDR) expression in coronary arterioles after 8 weeks of transdermal treatment with testosterone and VitD deficiency

A jelzések 20 mikrométeres távolságot jelölnek.

Tisztelettel köszönöm Ábrahám István Professzor Úr bírálatát és hogy dolgozatom elfogadását javasolta. Bízom benne, hogy kérdéseire adott válaszaimat is megfelelőnek találja.

Budapest, 2020. 12.14.

Dr. Várbíró Szabolcs

REFERENCIA LISTA

1. Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. (2000) Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol*, 167: 191-198.
2. Mayer LP, Dyer CA, Eastgard RL, Hoyer PB, Banka CL. (2005) Atherosclerotic lesion development in a novel ovary-intact mouse model of perimenopause. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 1910-1916.
3. Smith BJ, Carter DE, Sipes IG. (1990) Comparison of the disposition and in vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in the female mouse and rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 105: 364-371.

4. Springer LN, Flaws JA, Sipes IG, Hoyer PB. (1996) Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reprod Toxicol*, 10: 137-143.
5. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. (2020) Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. *Mol Cell Biochem*, 475: 261-276.
6. Cavelier L, Bonnet P, Morel G, de Ceaurriz J. (1996) Role of cysteine conjugation in vinylidene chloride-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in fasted rats. *J Appl Toxicol*, 16: 109-113.
7. Chhabra RS, Huff J, Haseman J, Jokinen MP, Hetjmancik M. (1990) Dermal toxicity and carcinogenicity of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in Fischer rats and B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 14: 752-763.
8. Acs N, Székács B, Nádasy GL, Várbíró S, Kakucs R, Monos E. (1999) The effect of ovariectomy and oestrogen replacement on small artery biomechanics in the rat. *Br J Obstet Gynaecol*, 106: 148-154.
9. Acs N, Székács B, Nádasy GL, Várbíró S, Miklós Z, Szentiványi M, Jr., Monos E. (2000) Effects of combined sex hormone replacement therapy on small artery biomechanics in pharmacologically ovariectomized rats. *Maturitas*, 34: 83-92.
10. Yanes LL, Romero DG, Moulana M, Lima R, Davis DD, Zhang H, Lockhart R, Racusen LC, Reckelhoff JF. (2011) Cardiovascular-renal and metabolic characterization of a rat model of polycystic ovary syndrome. *Gend Med*, 8: 103-115.
11. Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E. (2007) A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 148: 3781-3791.
12. Masszi G, Benko R, Csibi N, Horvath EM, Tokes AM, Novak A, Beres NJ, Tarszabo R, Buday A, Repas C, Bekesi G, Patocs A, Nádasy GL, Hamar P, Benyo Z, Varbiro S. (2013) Endothelial relaxation mechanisms and nitrate stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Life Sci*, 93: 133-138.
13. Masszi G, Horvath EM, Tarszabo R, Benko R, Novak A, Buday A, Tokes AM, Nádasy GL, Hamar P, Benyó Z, Varbiro S. (2013) Reduced estradiol-induced vasodilation and poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in the aortas of rats with experimental polycystic ovary syndrome (PCOS). *PLoS One*, 8: e55589.
14. Horváth EM, Benko R, Kiss L, Murányi M, Pék T, Fekete K, Bárány T, Somlai A, Csordás A, Szabo C. (2009) Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 52: 952-961.
15. Pál É, Hadjadj L, Fontányi Z, Monori-Kiss A, Lippai N, Horváth EM, Magyar A, Horváth E, Monos E, Nádasy GL, Benyó Z, Várbíró S. (2019) Gender, hyperandrogenism and vitamin D deficiency related functional and morphological alterations of rat cerebral arteries. *PLoS One*, 14: e0216951.
16. Hamelin BA, Méthot J, Arsenault M, Pilote S, Poirier P, Plante S, Bogaty P. (2003) Influence of the menstrual cycle on the timing of acute coronary events in premenopausal women. *Am J Med*, 114: 599-602.
17. Allais G, Chiarle G, Sinigaglia S, Airola G, Schiapparelli P, Benedetto C. (2018) Estrogen, migraine, and vascular risk. *Neurol Sci*, 39: 11-20.
18. Futo J, Shay J, Block S, Holt J, Beach M, Moss J. (1992) Estrogen and progesterone withdrawal increases cerebral vasoreactivity to serotonin in rabbit basilar artery. *Life Sci*, 50: 1165-1172.
19. Kasap M, Canaz H, Canaz G, Tokmak M, Bingul A, Alatas I. (2018) Morphometric Analysis of Dose-dependent Effect of Progesterone on Experimental Vasospasm-induced Rat Femoral Arteries. *Asian J Neurosurg*, 13: 271-276.
20. Abidi S, Nili M, Serna S, Kim S, Hazlett C, Edgell H. (2017) Influence of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on cerebrovascular resistance and cardiorespiratory function during Valsalva or standing. *J Appl Physiol* (1985), 123: 375-386.

21. Rakobowchuk M, Parsloe ER, Gibbins SE, Harris E, Birch KM. (2013) Prolonged low flow reduces reactive hyperemia and augments low flow mediated constriction in the brachial artery independent of the menstrual cycle. *PLoS One*, 8: e55385.
22. Limberg JK, Eldridge MW, Proctor LT, Sebranek JJ, Schrage WG. (2010) Alpha-adrenergic control of blood flow during exercise: effect of sex and menstrual phase. *J Appl Physiol* (1985), 109: 1360-1368.
23. Favre ME, Serrador JM. (2019) Sex differences in cerebral autoregulation are unaffected by menstrual cycle phase in young, healthy women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 316: H920-h933.
24. Neves LA, Averill DB, Ferrario CM, Aschner JL, Brosnihan KB. (2004) Vascular responses to Angiotensin-(1-7) during the estrous cycle. *Endocrine*, 24: 161-165.
25. Dalle Lucca JJ, Adeagbo AS, Alsip NL. (2000) Influence of oestrous cycle and pregnancy on the reactivity of the rat mesenteric vascular bed. *Hum Reprod*, 15: 961-968.
26. Cairrão E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. (2012) Non-genomic vasorelaxant effects of 17 β -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta Pharmacol Sin*, 33: 615-624.
27. Jaimes L, Vinet R, Knox M, Morales B, Benites J, Laurido C, Martínez JL. (2019) A Review of the Actions of Endogenous and Exogenous Vasoactive Substances during the Estrous Cycle and Pregnancy in Rats. *Animals (Basel)*, 9.
28. Zamorano B, Bruzzone ME, Martinez JL. (1995) Vascular smooth muscle reactivity to norepinephrine in ovariectomized rats: relationship to vascular PGE₂/PGF₂ alpha ratio. *Gen Pharmacol*, 26: 1613-1618.
29. Cooke CL, Davidge ST. (2003) Pregnancy-induced alterations of vascular function in mouse mesenteric and uterine arteries. *Biol Reprod*, 68: 1072-1077.
30. Oluyemi A., Okwuonu C., Baxter D., T.O. O. (2007) Toxic effects of methanolic extract of *Aspilia africana* leaf on the estrous cycle and uterine tissues of Wistar rats. *International Journal of Morphology*, 25: 609–614.
31. Parada M., Valenzuela-Barra G., Delporte C., H. L. (2014) Estrous cycle disruptor effect of an ethanolic extract from *Buddleja globosa* leaves and its main component (verbascoside) *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat. Caribe Plant. Med. Aromat.*, 13: 189–197.
32. Várбірó S, Sára L, Antal P, Monori-Kiss A, Tórkés AM, Monos E, Benkő R, Csibi N, Szekeres M, Tarszabo R, Novak A, Paragi P, Nádasy GL. (2014) Lower-limb veins are thicker and vascular reactivity is decreased in a rat PCOS model: concomitant vitamin D3 treatment partially prevents these changes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307: H848-857.