

Bírálat Dr. Czéh Boldizsár doktori értekezéséről

A jelölt dolgozata 28 cikken alapul 11ben első 4ben utolsó szerző. Talán a legrészletesebb és legtöbb anyagot tartalmazó doktori összefoglaló amivel volt szerencsém találkozni. Szépen körületekintően megtervezett egymásra épülő magatartási, anatómiai és élettani kísérletek logikusan felfűzött sorozata. Az irodalomban elsőként, egy krónikus (több hetes) stressz paradigmát használt, amely a szociális rangsorban elszenvedett veszteségen, „alárendelődésen” (social defeat) alapszik. A depresszió ezen krónikus modelljével kiváltott hatások számos aspektusát járta körül igen alaposan: prenatális és felnőtt neurogenezis, sejtpusztulás, morfológia, kapillarizáció, sejt funkciók és kognitív folyamatok vizsgálatával. Az értekezés egyértelműen bizonyítja, hogy a jelölt méltó az MTA doktora címre.

Igen meggyőző mennyiségű kísérlet és tanulmány képezi tehát a dolgozat alapját, melyekben jelölt sok helyen első vagy utolsó szerző. A magyar rendszerben egy közlemény csak egy doktori dolgozatban szerepelhet a közlemény alapjául szolgáló irodalomjegyzékben. A jelölt dolgozatában nincsenek szétválasztva ezek a cikkek az egyéb saját cikketől. Kérdésem, hogy itt is hasonló elvek szerint járt-e el a Jelölt, azaz a német kollegák hasonló fokozataiban megjelent vagy megjelenő munkák részét képezik-e a dolgozatnak vagy sem?

A dolgozat 87 oldal melyből 14 oldal aprón szedett irodalomjegyzék. Felvezetése érthető, alapos. A dolgozat segítőkész szerkesztésű: a munka alapjául szolgáló hivatkozások kiemelték és hasznos lábjegyzeteket tartalmaz. A eredmények összefoglalásában igen példamutató módon körüljárja, hogy eredményeiket azóta milyen mértékben használják más kutatócsoportok, illetve mely esetekben jutottak mások más konklúzióra (plNK1Rec agonista később nem vált be).

A szerkesztés gyengéje, hogy a nyitó felvezetés után az egyes kísérletek leírásánál a bevezetések zavaróan sokszor ismétlik a felvezetést és egymás részleteit. Több munka bevezetését, eredményeit és tárgyalását össze lehetett volna vonni, hiszen hasonló stresszt váltottak ki, hasonló csoportokat (kontroll, stressz, kontrol+AD, stressz+AD) használtak, mindössze a vizsgált célelem volt más. Érezni, hogy az egyes részek egyedi cikkek egymás utáni kivonatai.

Tartalmi észrveteleim és kérdéseim.

1.4, 12.o.: „A dendritfának eme zsugorodása illetve a szinaptikus kapcsolatok csökkenésének feltehető magyarázata az, hogy a neuronok így próbálnak védekezni a magas glutamát szint már toxikus hatásaival szemben.”

A magas glukokortikoid és a magas glutamát szint között mi az összefüggés?

3.5.1: „Az alsó és felső fókusz-síkokban előforduló egyedeket nem vettük figyelembe. A sejtszám összegét a BrdU jelölt sejtek számának ötszöröse adja.”

A pontos számolást adó disszektor módszerben csak az egyik felszínről kell elhagyni a vágott elemeket!. A hiba szerencsére csak akkor jelentős, ha abszolút sűrűséget számolnak. Itt csak relatív változást mértek. Nem értem miért pont a sejtszám 5xöse az eredmény? Minden 5. metszetet vizsgáltak?

3.4 ábraszöveg alján valahonnan odakerült 4 sor található

4.1 „patkányokban a ragadozó (róka) szagának érzékelése már egyetlen alkalom után is képes a szemcses sejtek proliferációját redukálni”. Biológusként kicsit extrém, eltúlzott reakciónak érzem, nem tűnik túl adaptívnak, hiszen egy vadon élő állat naponta találkozhat hasonló esetekkel. Mi erről a véleménye? Lehet egy „sterilen” tartott, rossz stressz-küszöbkel rendelkező kísérleti állat reakciója? Vagy egy mechanizmus az emlényomok egyfajta megőrzésére? Hiszen ha képződik sejt akkor el is kell tűnnie! Van erre adat?

Már korábban is felmerült bennem a kérdés: BrDU-val nézte-e valaki, hogy meddig él egy szemcses sejt? Értelmszerűen egy periódusban megjelölt sejtek számának csökkenése (kontroll állatokban) mérhető. Vagy ez a módszer nem alkalmas erre?

4.3. 29.o.: „AN csökkenése hozzájárul-e a hippocampus egészének volumen csökkenéséhez. Meglepetésünkre, a szemcses sejt réteg térfogatát változatlanul találtuk. Ebből arra következtettünk, hogy a csökkent AN a gyrus dentatus-ban nem lehet a hippocampus volumen csökkenésének közvetlen oka.”
De akkor fel kell tételeznünk, hogy a sejtpusztulásnak is meg kellett állnia!

4.4.1 31.o.: „várakozásainkkal ellentétben a TMS kezelés - az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben - nem volt képes normalizálni a stressz-indukálta hippocampális AN csökkenést.”.
Mivel a HPA tengelyre hat akkor szükségszerűen nem lehet szigorú összefüggés a HPA tengely működése és az AN csökkenése között. Párhuzamos következményei a stressznek! Erről mi a véleménye?

4.4.2 33.o.: Szükségtelen megint leírni a „stressz onlyt” meg a kontrollt mikor ugyanaz a paradigma

4.5 35.o.: „Meglepetésünkre a hippocampus egészét tekintve az apoptotikus sejtek számának szignifikáns csökkenését találtuk a stresszelt csoportban, miközben az entorhinális kéregben krónikus stressz növelte az apoptotikus sejtszámot”
Nem lehetséges, hogy a változások hatására a sejtek gyorsabban mennek át a jelölést adó apoptotikus állapotra és ezért egy adott pillanatban kevesebb jelölt sejt látható?

36.o.: „Az apoptózis kimutatására ismét a megbízható ISEL technikát használtuk. Ezzel a módszerrel nyert adatok szerint az apoptotikus sejtek száma igen alacsony, metszetenként egy-egy régióban átlagosan 4-6 ISEL-pozitív sejtet láttunk jelentős egyedi szórásokkal”. Sokat nézegettem CA1 metszeteket és egy CA1 metszet radiatúrájában, patkányban/egérben sok nagyságrenddel több sejt nem is látható, ha a sejtek rövid ideig jelöltek már a kontroll állatban sem maradna sok idegsejt 1-2 hónap után. Tudtommal itt nincs de novo sejt képződés. Hogyan oldható fel az ellentmondás?

4.6. „Milyen egyéb sejtszintű mechanizmusok csökkentik a stressz kapcsán a hippocampus térfogatát? Számolhatunk-e a glia sejtek vagy a kapillarizáció redukciójával?” fejezet cím.

A neuronok nyúlványrendszerének redukciója egy kézenfekvő lehetőség lenne. Ezt miért nem vizsgálták itt? Vagy ezt addigra már leírták (mások)? Itt miért fluoxetint használtak amikor előző tanulmányaikban másik antidepresszánt használtak?

40.o.: „A mókuscickányok hippocampusának anti-GFAP jelölése után az immunjelölődés intenzitásának markáns különbségét figyeltük meg, mégpedig a stresszelt állatokban mutatkozott a jelölődés szemmel láthatóan gyengébbnek”. Tapasztalataink szerint különböző beavatkozások, pl ha stresszes az állat, jelentősen befolyásolhatja a perfúziós minőségét és jelentős különbségekhez vezethet az immunfestésben! Később a pályázó mutatta is, hogy a vaszkularizáció megváltozik. Ellenőrizték más, várhatóan nem változó, immunfestésekkel hogy nem ebből fakad a festés erősségének megváltozása?

41.o.:” Ezzel szemben a kontroll és kontroll + fluoxetinnel kezelt állatok között nem volt eltérés...”

Az előző kísérletben (apoptózis) az antidepresszáns a kontrollban csökkentette a pusztulást. A különbség betudható-e a másik antidepresszáns hatásának, hiszen hasonló sejteken volt valószínűleg a pusztulás!?

4.7. 46.o.: „Először azt ellenőriztük, hogy vajon a szelet készítés önmagában nem deformálja-e a neuronok dendritfáját.”

Mi volt a kontroll amivel összehasonlították.

A kortikoszteron szint befolyásolja a CA3 piramissejtek tulajdonságait, többek között dendrit hosszát. Feltételezhető, hogy ennek valamilyen funkcionális szerepe lehet azon a szinten mielőtt még a kóros folyamatok beindulnának. Mi lehet a szerepe ennek a mechanizmusnak?

51: „mind az sIPSC 10 frekvencia mind az sIPSC amplitudó gyors növekedését figyeltük meg.” Nem magyarázható-e ez egyszerűen a sejt input rezisztenciájának növekedésével?

53.o.: „Akut stressz után az sIPSC frekvencia megnőtt a kontroll (nem stresszelt) állatokhoz képest, ugyanakkor az sIPSC amplitudó változatlan maradt”. Mivel magyarázható, hogy itt nem nőtt az amplitudó?

55.o.: „tápoldatába kevert 5 mM carbacholt használtunk a ritmikus sIPSC jelek keltésére”
A mi kísérletinkben 2-3uM CCh elég volt, hogy gamma oszcillációt váltson ki. 10 uM jelentősen csökkentette a szinaptikus átvitel erősségét és erősen depolarizálta a sejteket. A három nagyságrenddel nagyobb CCh milyen hatásokat váthat ki? Miért ebben a koncentrációban használták?

„carbachol adása utáni sIPSC aktivitási szakaszokon végzett power spektrum analízis szerint minden sejtben szignifikánsan nőtt a total power és ezen belül egy éles power csúcs fejlődött ki a 4-14 Hz-es téta frekvencia tartományban”

A szakirodalomban található kísérletek zömében CCh applikáció gammát vált ki, igaz sokkal kisebb koncentrációban. Mi lehet a különbség oka? Mennyiben tekinthető a fenti

4-14Hz-es oszcilláció hasonlónak az in vivo theta-hoz? Lehetett-e a különböző rétegekben az in vivo-hoz hasonló polaritásfordulást és fáziseltolódást látni (hasonló áramok generálják-e)? A finomszerkezete milyen volt, tartalmazott-e theta-fázis-modulált gammát?

4.1.8 ábra: Hogyan magyarázza, hogy csak frekvencia változott, de az amplitúdó nem nőtt?

4.8 54.o.: „Krónikus stressz hatására csökken a PV-immunoreaktív neuronok száma, miközben a CCK-pozitív sejteké változatlan marad”

Nem diszkutálta, hogy a PV+ sejtszám csökkenése a PV-eltűnésnek vagy a sejtek pusztulásának eredménye. Ha sejtpusztulásról van szó, miért nem vált ki epilepsziát a stressz indukált PV-sejtpusztulás?

Végezetül gratulálok a Jelöltnek munkájához, melyben a következő fontosabb megállapításokat tette:

- a krónikus stressz a felnőtt hippocampusban zajló neurogenesiset gátolja.
- az életkor egészen korai szakaszában, akár prenatálisan is, elszenvedett stressznek a felnőttkori neurogenesisre illetve a hippocampus térfogatára hosszú távú következményei vannak.
- a zsugorodása hátterében többek között a gliasejtek (asztrociták) pusztulása, illetve a hippocampus kapillarizációjának csökkenése is szerepelhet.
- prenatális stressz rhesus majmokban pszicho-motoros és neuro-endokrin fejlődési zavarokhoz vezet.
- antidepresszáns kezelés ellensúlyozni képes a stressz hippocampális felnőttkori neurogenesisre gyakorolt gátló hatását.
- a hippocampus CA3 piramis sejtjeinek aktív elektrofiziológiai tulajdonságai csak kismértékben változnak, pedig ezek a neuronok krónikus stressz hatására szignifikáns dendritfa átrendeződéssel reagálnak.
- hippocampus-dependens memória feladatokban nem láttak kognitív deficitre utaló jeleket.
- a GABAerg neuronok közül elsősorban a csak kevésbé plasztikusnak tartott parvalbumin-pozitív sejtek működése változik meg.
- további bizonyítékot találtak a „membrane-bound” glukokortikoid receptorok létezésére.
- a prefrontális kortexben tartós stressz, illetve antidepresszáns kezelés hatására a hippocampushoz nagyon hasonló sejtszintű elváltozások keletkeznek.
- további bizonyítékokat találtak a prefrontális kéreg féltekei lateralizációjára nézve

Mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását és számára az MTA doktora cím odaítélését.

Budapest 2012. szeptember 12.

Dr Gulyás Attila
az MTA doktora