Wigner Fizikai Kutatóközpont, Eötvös Loránd Kutatási Hálózat

Komputációs Tudományok Osztálya, Elméleti Idegtudomány és Komplex Rendszerek Kutatócsoport

1121 Budapest, Konkoly Thege Miklós út 29-33.

Tel: +36 1 392 2222 ext. 1238, Email: negyessy.laszlo@wigner.hu,
Web: http://cneuro.rmki.kfki.hu/people/laszlo-negyessy/

VÁLASZ
Dr Kisvárday Zoltán bírálatára

Köszönöm Dr Kisvárday Zoltánnak, hogy elvállalta az értekezésem bírálatát és a hiányosságok feltárásával lehetőséget adott azok tisztázására.

A formai kritikára és észrevételekre adott válaszaim, azok bírálatban megfogalmazott sorrendjében.

1. „... magyarul íródott és nem angolul. ...”

A doktori értekezésre vonatkozó szabályok szerint kérhettem volna, hogy angol nyelven írjam az értekezést (ez egyébként megkönnyítette volna a dolgomat), azonban kihívásnak éreztem, hogy magyarul fogalmazzam meg a tudományos tevékenyégemmel kapcsolatos ismereteket, gondolatokat elkerülve, amennyire csak lehet, egy kevert nyelvű szleng használatát.

2. „...a disszertáció téma szerinti fejezeteinek beosztása és a tézis füzet témafejezeteinek beosztása közötti diszharmónia... A disszertációban 4 fő téma kerül kifejtésre, ugyanakkor a tézisfüzet 3 témafejezetet tartalmaz, bár ugyanaz a tartalom, de a tagolás mégis más.”

Az eltérést a TNAP témafejezet besorolása okozza: a disszertációban külön D. fejezetként szerepeltetem, míg a tézisfüzetben a C. „Az élek szerkezete és szerepe...” c. fejezetbe olvasztva, egy külön pontban. A tézisfüzetben a fejezetek összeolvasztásával az volt a célom, hogy egyértelműsítsem az értekezésem azon koncepcióját (ld. értekezés Bevezetés, A. fejezet, 13. o. utolsó két bekezdés és a TNAP-al kapcsolatos fejezetek főcímei), hogy a TNAP az agykérgi hálózatban a szinaptikus aktivitás szabályozásán keresztül az élekhez kapcsolódó funkciót lát el. Erre a tézisfüzet terjedelmi korlátja miatt ezt a kifogásolható megoldást találtam célravezetőnek. Ugyanakkor, részben az alábbiakban megfogalmazott módszertani okból (ld. alább Szakmai észrevételek), valamint a TNAP vizsgálatával kapcsolatos eredmények terjedelmét és összetettségét tekintve az értekezésben a téma kifejtése önálló fejezetet kívánt.

3. „zavaró ... a fejezetek, alfejezetek és a további szövegtagoláshoz használt sorrendi jelölés megválasztása... Négy fajta jelöléssel találkozunk... Az eklektikus jelölés helyett a jól bevált arab számokkal és ponttal való szövegtagolás segítette volna a mű könnyebb átláthatóságát.”

A bírálat szerint a szándékommal pontosan ellentétes hatást értem el. A nagybetűkkel igyekeztem a nagyobb témaköröket egyrészt egymástól könnyen megkülönböztethetővé tenni, másrészt az értekezés módszertanin kívüli 6 fő részében könnyen azonosíthatóvá és követhetővé tenni. A tagolás további szintjeinek értekezésen át történő azonosíthatóságára

pedig átláthatóbb megoldásnak gondoltam a különböző jelölések következetes használatát. A tagolás jelölése ilyen formán bonyolultnak tűnhet. A bíráló véleménye teljes mértékben elfogadható és helytálló.

4. „Ettől komolyabb kifogásom, hogy a tézisfüzetben feltüntetett 15 saját publikáció közül, amelyek a disszertáció tudományos tartalmát megalapozzák csak részben jelennek meg a disszertációban, illetve annak irodalomjegyzékében. A szerző összesen 7 saját publikációra hivatkozik a disszertációban a tézisfüzetben található 15 helyett."

A társszerzőségemmel készült közlemények egy részéből csak bizonyos részeket használtam fel, azokat, melyek szorosan kapcsolódtak az értekezés tematikájához és amiben a hozzájárulásom is jelentős volt. Ugyanezen közlemények más, az értekezésben nem kifejtett, de felhasznált eredményeit hivatkozással jeleztem. Azokat értekezés alapjául szolgáló közleményeket, amelyeknek az eredményeit teljesen felhasználtam az értekezésben nem citáltam. Másik bírálat hasonló észrevételeit is figyelembe véve a bíráló feladatát megkönnyíthette volna, ha mindezt az értekezésben pontosan jelzem.

5. „...két hivatkozás nem található az Irodalomjegyzékben (103.o., Wang et al, 2013). Egy ábrahivatkozás téves (104.o. 34.ábra) 5). A 34. ábra elektrofiziológiai adatokat mutat a kereszt-korrelációs feldolgozásban, azonban nem egyértelmű, kinek a munkájáról van szó (hiányzik a hivatkozás)."

A Wang et al. (2013) közlemény (ebben megosztott elsőszerző vagyok) eredményeit felhasználtam az értekezésben, ezért nem hivatkoztam rá. Azonban a kifogásolt mondatban a szöveg kontextusa „...(bővebben az eredeti közleményben: Wang és mtsi., 2013 Supplemet, S3D,E ábra)." megkívánta volna a közleményt feltüntetését hivatkozások listájában. A 34. ábra ugyanebből a közleményből származik és az Eredmények B.I.6.b. „Idegsejtek tüzelésének korrelációja" fejezet összefoglaló ábrája. Miután saját eredmény, külön nem hivatkoztam rá.

A szakmai észrevételekre adott válaszaim, azok bírálatban megfogalmazott sorrendjében.

0. „Ez utóbbi (TNAP) témával kapcsolatban ... szerencsésebbnek tartottam volna, ha nem kerül a disszertációba... Míg az első három téma koherens abban a tekintetben, hogy az agykéreg área és sejtszintű huzalozásával, valamint funkcionális következményeivel foglalkozik, ugyanez közvetlenül nem mondható el a molekuláris szintű regulációt érintő TNAP jelátviteli szerepének vizsgálatáról."

Egyetértek a bírálóval, a TNAP téma kakukktojás abban az értelemben, hogy nem pályajelöléses munkák eredményét tárgyalja. Azért döntöttem az értekezés kontextusában való bemutatása mellett, mert új és megítélésem szerint fontos eredményeket tartalmaz, jelentős klinikai vonatkozásokkal. Szerettem volna erre a hazai tudományos közösség figyelmét is felhívni. A téma agykérgi hálózattal összefüggésben való tárgyalása ehhez fontos iránymutató lehet további, akár klinikai vizsgálatok (pl. ritka betegségek) számára.

1. "Az agykéregben vizsgált heterogén axon populációt felosztották myelinizált és nem myelinizált axonok társaságára. Véleményem szerint túlságosan is le van egyszerűsítve a feladat, azaz a myelinizált axonok forrását és terminációját is meg kellene határozni, ami szerintem nem mindig sikerült. Mivel az alkalmazott jelölőanyagról (BDA) korábbi tanulmányok igazolták, hogy képes a beadás központi régiójában átfutó axonokat jelölni, ezért óvatosan kell kezelni a jelölt axonokat. Mely tulajdonságok alapján határozták meg, hogy a jelölt axonok tényleg a beadási helyről jelölődtek?"

Erre csupán indirekt módon következtethettünk az axonok, elsősorban a csupasz, boutonokkal tarkított csoport morfológiájából. A beadáshoz közelebb eső és onnan sugárirányban szétterjedő szegmensek vastagabbak, könnyen beazonosítható irányultsággal és kevés elágazással rendelkeztek a távolabbi vékonyabb, kanyargós és gyakran elágazó társaiknál. Az általunk jelölt axonok tartalmazhatnak átfutó rostokat, ezek aránya viszont alacsonyra becsülhető annak figyelembevételével, hogy az agykéregben az összeköttetések döntő hányada (kb. 80%, Horvát és mtsi., 2016) lokális, a beadástól számított pár száz mikrométeren belül ered (a beadás mag régiója, ld. Eredmények B.I.2. „A BDA-jelölés jellemzése"). A mielines axonok eredetének azonosítására az egymástól meghatározott távolságban gyűjtött metszet sorozat nem ad esélyt, mert a szegmensek csak egye-egy metszeten követhetők a folytonosság hiánya miatt. A mielinizált axonok esetében a döntően inter-áreális irányultságuk csoporton belüli és csoportok közötti (área 3b vs. área 1 beadások) konzisztens eloszlása ad némi bizonyosságot azt illetően, hogy legalább egy jelentős hányaduk a beadási helyről ered.

2. „Kérdésem, hogy a kis- és nagyméretű axon terminálisok közötti mérethatárt miért 1 um-re állították be?"

Lényegében saját tapasztalatokra és irodalmi adatokra alapozva választottuk ezt a mérethatárt. Ezt ugyanazon fejezetben meg is fogalmazom: „Bár az agykérgi axonvégződések általában kicsik, 1 µm-nek megfelelő vagy annál kisebb átmérőjűek, a nagy végződések átmérője meghaladhatja az 1 µm-t (ld. saját eredmények és Anderson és mtsi., 1998; Anderson és Martin, 2006, 2009; Covic és Sherman, 2011; Innocenti és Caminiti, 2017). Az 1 µm-es mérethatár megválasztása megkönnyítette a nagy boutonok kiválasztását és fénymikroszkópos feltérképezését, és segített csökkenteni a számos 2. típusú bouton torzító hatását az területi eloszlás eredményére." Továbbá, amint ezt ugyancsak megjegyzem ugyanitt az értekezésben, ez a méret még viszonylag biztonsággal kezelhető volt az ozmiumos metszetek fénymikroszkópos tanulmányozásában. Utólag, az adatok elemzésének eredménye szerint mindenesetre az 1 um jó választásnak bizonyult.

3. „Kérdésem, fenntartható-e az illesztés 10 um-es precizitása és egyáltalán szükség van-e erre a meglehetősen nagyfokú térbeli pontosságra a funkcionális és anatómiai térképek közötti korreláció méréséhez?"

Köszönöm a bíráló észrevételét, fontos adatokra hívta fel a figyelmemet, amit a tanulmányainkban nem vettünk számításba. Ezek szerint a mikroszkópos rekonstrukciók intrinzik optikai jellel készült funkcionális térképpel való illesztését a bíráló által leírt hatások akár 130 um-el is torzíthatják. Szerencsére vizsgálatainkat az ujjbegy reprezentációra fókuszáltuk, aminek a mérete egy kérgi oszlopénak a sokszorosa. Az ujjbegy általunk tanulmányozott 2 mm átmérőjű részére lokalizált felszínének kérgi reprezentációja milliméteres méretskálával mérhető. Ez a nagyságrendi eltérés viszonylag jól kompenzálja az

illesztés torzító hatásait. Fontos ugyanakkor, hogy az illesztést nagy térbeli pontosságú elektrofiziológiai térképekkel is elvégeztük. Ebben az esetben az elektróda szúrcsatornák lokalizációja és az agyfelszíni fotón jelölt mérőpontok szolgáltak referencia pontként. Ilyen módon a bíráló által megadott adatok alapján durván 30 um-es torzítással számolhatunk, ami elhanyagolható az általunk célul kitűzött szomatotópiás lokalizáció pontosságát illetően.

4. „A BDA jelölőanyag bejuttatása után 14 nap túlélést hagytak az állatoknak. Ez szokatlanul hosszú időnek számít összehasonlítva más munkákban végzett hasonló jelölési kísérletekkel. Végeredményben néhány (3-5) mm távolságra történő jelölőanyag transzportjáról beszélünk, amit a gyors típusú transzport mechanizmus elvileg kevesebb, mint egy óra alatt teljesíteni tud. Mindezek fényében mivel magyarázható a hosszú idejű túlélés alkalmazása?"

Az elérhető legerősebb jelöléshez a lassabban terjedő, nagy molekula tömegű (10K) BDA transzport idejét vettük figyelembe. Irodalmi adatok alapján: „Transport is estimated to span 15–20 mm of tract in 1 week" (Lanciego and Wouterlood 2020). Ezért legalább 10 napos túlélési idővel számoltunk. A hosszabb túlélési időt nem tartottuk limitáló faktornak a BDA szöveti stabilitása miatt: „BDA remains stable in the rodent brain up to 4 weeks post-injection, while in primates, it may remain detectable up to 7 weeks after application." (Lanciego and Wouterlood 2020).

5. „Hogyan lehet a retrográd és anterográd axon jelölést megkülönböztetni?"

Axon szegmensek, tehát nem terminális elágazódások (foltok), esetén ez csak az axon teljes rekonstrukciójával volna lehetséges. A fent részletezettek szerint a mi kísérleti megközelítésünk ezt nem tette lehetővé. A tanulmányainkban a fókuszt a specifikus célterületeket (efferens területek) azonosítani képes axonfoltok eloszlására helyeztük, így csökkentettük az esetleges műtermék mértékét. Ez a probléma tehát azon eredményeink esetében okozhatott nehézséget, ahol az axon szegmensek eloszlását vizsgáltuk, nevezetesen az Eredmények, C.I. „Axonmorfológia: csupasz és velőshüvelyes rostok eloszlása a szürkeállományban" fejezetben. Ennek okán a 3b és 1 áreák közötti reciprok mileines axonális összeköttetés erősségének, azaz a mielines rostok eloszlási preferenciájának azonosítása további vizsgálatokat igényel. (pl. fluoreszcens monoszinaptikus vírusjelöléssel kombinált mielin-immunhisztokémiával).

6. „A projekciós idegsejtek csoportosítása klaszterezési algoritmussal történt. Nagyon sokféle klaszterezési algoritmus létezik (pl. K-means, Mean-shift, Gaussian Mixture Models, DBSCAN). Miért a DBSCAN-t módszert használták?"

Erre a kérdésre a módszertani részben a B.II.6.a fejezetben (51. o) válaszolok: „...a klaszterek azonosítása helyett a klaszteresedés tendenciáit hasonlítottuk össze a különböző afferens pályák esetén. A DBSCAN előnye, hogy nem igényel feltételezést a klaszterek számával kapcsolatban, nem érzékeny a klaszterek méretére, alakjára vagy lokalizációjára, ami előnyösebbé teszi más rekeszméret (binning) meghatározáson alapuló vagy K-közép (K-means) klaszterezési technikákkal szemben." A klaszteresedés tendenciáit pedig, „...a klaszterezést a hosszparaméter függvényében vizsgáltuk, nem pedig egyetlen konkrét értéket kiválasztva...". Ebből a szempontból előnyösebb, mint a klasztereket azonosító iteratív Mean-shift klaszterezés, vagy a parméteres kevert Gauss modelleken alapuló klaszterezés.

7. „Clasca és munkatársai (Cerebral Cortex, 2018) szerint a PSD kiterjedése lineárisan korrelál a posztszinaptikus tüskék felszín méretével. Szinaptikus kapcsolatok tekintetében nem ez az egyetlen strukturális paraméter, ami a PSD méretével korrelál. Ezért is meglepő, hogy a figyelembe vett preszinaptikus paraméterek egyike sem korrelált: sem a bouton-, sem a MITok felszíni mérete. A dokkolt vezikulák sűrűségének megmérése talán segített volna, amiről kimutatták, hogy korrelál a transzmitter felszabadulás valószínűségével. Miért nem végeztek szinaptikus vezikula paraméter méréseket (méret, alak, távolság, denzitás)?"

A postszinaptikus struktúrát, a PSD-t kivéve, nem vizsgáltuk, tehát csak a preszinaptikus struktúrára érvényes következtetéseket vonhatunk le az eredményeinkből. Szeretném megjegyezni, hogy az idézett munkában közölt, sajátunkéval összehasonlítható eredmények nagyon jó megegyezést mutatnak; pl. csak a PSD-vel kapcsolatban a PSD- vs. bouton felszín korrelációja náluk is kicsi, a MITok méretével pedig nem vetették össze a PSD méretét. A feltett kérdésre válaszolva, a szinaptikus vezikula kvantitatív eloszlásának mérésére tett kísérletünk sajnos kudarcba fulladt. A NiDAB jelölés (ami segített a fénymikroszkópiában) és az ólom-citrátos kontrasztozás olyan mértékben elfedte a szinaptikus vezikulumokat, hogy azok jelentős részét csak nagy bizonytalansággal tudtuk azonosítani. Ezért ezzel a vizsgálatunkkal fel kellett hagynunk.

Az értekezésben nem szereplő hivatkozás

Lanciego JL, Wouterlood FG. Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral. Brain Struct Funct. 2020 May;225(4):1193-1224. doi: 10.1007/s00429-020-02041-6. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32062721; PMCID: PMC7271020.

Budapest, 2023. március 3.

Négyessy László