

Dr. Gaszner Balázs:

A stresszválasz és a hangulatzavarok háttérben álló neuropeptiderg mechanizmusok vizsgálata rágcsláló modellekben -című MTA doktori értekezésének bírálata

Bíráló: Dr. Dobolyi Árpád

Tematikailag a dolgozatnak egy jelentős része a PACAP peptid neuromodulátor rendszer szerepének megértését szolgálja. Ez egészül ki a peptidnek más peptiderg rendszerekkel való kölcsönhatásával, valamint általánosítódik a szorongás és depresszió-szerű viselkedés agyi mechanizmusainak a megértése irányába. Mindezen szabályozások valóban alapvető fontosságúak a magasabb idegrendszeri működések megértése céljából. Ezen eredmények előkészítése a Bevezetésben megfelelően megtörténik. A dolgozat további, szintén jelentős kísérleteket is tárgyal, így farmakológiai megfontolásokat, és a tranziens receptor potenciál ankirin 1 fehérje funkcióját. Ezen anyagok önmagukban értékes megállapításokhoz vezetnek, de a dolgozatba való integrációjuk nem lett tökéletesen megoldva, ennek egy jele, hogy a tranziens receptor potenciál ankirin 1 fehérje nem lett megfelelően bemutatva a dolgozatban. Egy másik példa, hogy a Bevezetést nem sikerült teljesen egységesíteni, hogy a PACAP és PAC1 receptor fejezetbe került a Hangulatzavarok ismertetése, viszont a szorongás bemutatása egy előtte levő, külön fejeztben történik.

Az értekezés 12 eredeti tudományos szakcikkre épül, melyek közül a szerző 1 esetben első, másik 11 esetben pedig utolsó szerzőként szerepel. A bemutatott eredményekhez való meghatározó hozzájárulása ezek alapján egyértelmű. Az első szerzős cikk Q1-es minősítésű, az utolsó szerzősök közül 3 db D1-es, 6 Q1-es, és 2 db Q2-es közlemény. Emellett egy-egy utolsó szerzős összefoglaló közleményt, illetve könyvfejezetet is felhasznált a dolgozat.

Formai szempontból a dolgozat megfelelő, kissé talán hosszabb a szokásosnál, 265 oldal idézetek nélkül, amit részben magyaráz a számos szövettani ábra. A dolgozat alapvetően a tudományos munkáktól elvárható fejezeteket tartalmazza. A szövege olvasható, az ábrák szépek, az elütések száma kevés (pl. 35. oldal: bázisrend, 40. oldal: érdeképen). Az Eredmények rész 5 egymással összefüggő célkitűzést tárgyal, ami megfelelő kereteket biztosít a bemutatott anyag feldolgozásához.

Az említett kisebb kritikák nem érintik a dolgozat lényegét, ami számos új, az idegrendszer működését érintő alapvető felfedezés leírását tartalmazza. Ezek közül a bíráló a következőket fogadja el **új eredményként**:

1. A PACAP génkiütött egerek csökkent szorongási szintet és megnövekedett depressziószintet mutattak. PACAP hiányában egyes CRH és urokortin neuronok nem reagálnak krónikus stresszben, valamint a dorzális raphe mag szerotonin tartalma csökkent.
2. Bizonyították a tranziens receptor potenciál ankirin 1 (*Trpa1*) jelenlétét az EW mag urokortin 1 neuronjaiban és megfigyelték a *Trpa1* mRNS csökkent kifejeződését krónikus stresszben, egérben. Ehhez hasonló jelenséget láttak öngyilkosok férfiak EW mintáiban.

3. Sikerrel igazolták a depresszió háromféle okát magában foglaló modell konstrukciós, fenomenológiai és prediktív validitását, Willner szerint. A PACAP heterozigota egereken alkalmazott anyai megvonás és stressz agyterület-specifikus funkcionális-morfológiai és epigenetikai változásokat okozott a hangulatszabályozásban szerepet játszó előagyi és agytörzsi központokban.
4. Leírták a stresszadaptáció idegsejtszintű vizsgálatára alkalmazott markerek kifejeződésének életkorfüggő dinamikáját. A FOS és FOSB/ Δ FOSB azonnali géntermékek agyterület- és stresszorspecifikus életkorfüggő dinamikáját figyelték meg, mely a CRH termelő sejtekre is jellemző volt a hypothalamus-ban, és a tágabb értelemben vett amygdala területén.
5. Megmutatták, hogy az Edinger-Westphal mag urokortin 1 neuronjait alpha-MSH és agouti related peptide tartalmú idegrostok idegzik be. A sejtek felszínén jelen lévő melanocortin 4 receptor farmakológiai manipulációja során tett megfigyeléseik arra utalnak, hogy az alpha-MSH hőszabályozásban és táplálékfelvételben megnyilvánuló hatását legalább részben az urokortin 1 neuronok útján közvetíti.
6. Eredményeik szerint a rotenon modellben a peptiderg Edinger-Westphal mag a substantia nigra dopaminerg idegsejtjeiben ismert károsodásokat szenved el, mely neurodegenerációban, Lewy testek megjelenésében, neuroinflammatorikus folyamatokban nyilvánul meg. A mag túlélő sejtjeiben sejtduzzadás, az urokortin 1 mRNS mennyiségének csökkenése, és a peptid felhalmozódása volt látható, mely magyarázhatja a betegség nem motoros tüneteként megjelenő depressziót.

A bírálónak a következő **kérdései vannak a jelölthöz:**

1. A bevezetésben keveset tudtunk meg a PACAP és receptora, valamint a Trpa1 agyi eloszlásáról, pedig ez fontos lenne, hogy közvetlen vs. közvetett hatásokat megítéljük. Milyen mértékben fejeződnek ki ezen gének a vizsgált, szorongásban és depresszióban érintett agyterületeken más agyterületekkel összehasonlítva?
2. A jelölt mutatja a három találat elmélet modelljében túlélő egerek számát, mely szerint a PACAP KO egerek aránya (14.7%) alacsonyabb volt, mint azt a mendeli törvények (25%) alapján várható volna. Kérdésem, hogy a genotipizálaskori fiatal korban, vagy a kísérlet végén van mutatva a túlélő állatok száma? Jelentős volt a két időpont közötti (vagyis a stresszkezelés hatására) az elhalálozás? Ha igen, talán érdemes lenne mindkettőt mutatni. Irodalmi adatok mekkora a PACAP KO állatok születési aránya? Ahhoz képest is kevés a 14,7%?
3. A leírásuk szerint a peroxidázos immunhisztokémiát nikkell-szulfát nélkül alkalmazták. Kérdésem, hogy ennek mi volt az oka, hiszen általában intenzifikálni szokták a DAB jelet?
4. Az astrocyta és microglia aktivitást a gliasejtek morfológiájának értékelésére alkalmazott pontrendszer szerint értékelték. Mikroglia aktivációra visszahúzzák a nyúlványaikat, megnő a sejttest mérete. Astrocytáknál hogyan következtek a morfológiából az aktivációra?
5. Vad típusú kontroll állatok esetén 2 különböző kísérletben (PACAP-5.1 ábra, és 3 hot modell, 5.16 ábra) nagymértékben különbözött az elásott üveggolyók száma (kb. 20 vs.

- kb. 2). A két kísérletben az alap cortikoszteron szintekben is jelentős különbséget mértek. Mi lehet a kontroll csoportok közötti jelentős különbségek oka?
6. Ha a PACAP állatokban csökkent szorongást és depressziót mérünk, akkor miért feltételezhető, hogy a heterozigóták predisponálják a depresszió-szerű viselkedést?
 7. A három találat modellben mennyit számított a PACAP heterozigóta egerek használata? Eredményei szerint a chronic variable mild stressz anyai deprivációval kombinálva a vad típusú állatban is hasonló depresszió-szerű viselkedést okoz. Milyen esetben és miért ajánlja, pl. egy gyógyszergyárnak, a PACAP het állatok használatát?
 8. Miért más agyterületekre fókuszál a stressz-indukált c-Fos aktiváció esetén (amygdala, BNST, septum, PVN), és a FOSB/ Δ FOSB esetén (mPFC, hippocampus)? A különböző immediate early gének más területeken aktiválódnak?
 9. Annak tesztelésére, hogy a chronic variable mild stress globális hatással van-e a Trpa1 expressziójára, ganglion trigeminale mintákon RT-qPCR mérést végzett. Talán jobb lett volna azonos módszerrel, másik agyterületen (és nem a periférián) végezni el ezt a validálást. PCR-el kimutatható a Trpa1 expresszió változása az EW mag területén?
 10. Bár az erőltetett úszás tesztet nem tartja teljesen megbízhatónak, a cukorpreferencia tesztet sok kísérletében nem végezte el. Mi ennek az oka?
 11. Az epididymalis zsírba 2 μ l Ba-DupGreen vírust injektáltak, ami zöld fluoreszcens fehérjét fejezett ki a fertőzött idegsejtekben. A perfundálásig eltelt 5 nap elég sok idő. Specifikusnak tekinthető még a jel? Hány szinapszison ment át a vírus? Mennyire volt tele az agy fertőzött sejtekkel?
 12. Mennyire specifikus az EWcp/UCN1 neuronok érintettsége a rotenon modellben? Más sejtek nem pusztulnak, és nem mutatnak funkcionális károsodást ezen kezelés hatására?
 13. A szelektív EWcp/UCN1 neuron abláció eredményeiből mennyire következtethetünk arra, hogy ezek a sejtek csak a Parkinson kór tüneteként bekövetkező hangulatváltozásokban érintettek?

Összefoglalás

A jelölt a peptid neuromodulátor rendszerek és a depresszió idegi mechanizmusait illetően számos új megállapítást tett, és ezzel jelentősen hozzájárult a magasabb szintű központi idegrendszeri működések megértéséhez. Az értekezése mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel az MTA doktora fokozat megszerzéséhez támasztott követelményeknek, a munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom a cím megszerzéséhez, és ezért **az értekezés nyilvános vitára tűzését és a cím odaítélését támogatom.**

Budapest, 2024. július 16.



Dr. Árpád Dobolyi
Élettani és Neurobiológiai Tanszék
Eötvös Loránd Tudományegyetem