

Opponensi vélemény Dr. Zelena Dóra Tímea *A vazopresszin szabályozó szerepe stresszben és stresszhez kapcsolódó kóros folyamatok során* c. MTA doktori értekezéséhez

Tiszteletre méltó volumenű munkát tart kezében az olvasó. A megközelítően két évtizedet felölelő elmélyült, pontos és részletes kutatói erőfeszítés eredménye a témában megjelent 40 eredeti közlemény, kivétel nélkül rangos szaklapokban; a tanulmányok feléne magá az értekezés elkészítője az elsőszerzője.

A vazopresszin stresszreakcióban betöltött szerepét, valamint ennek lehetséges jelentőségét különböző kóros folyamatokban hatalmas módszertani arzenál segítségével járta körül a viselkedéses vizsgálatoktól a klasszikus kísérletes endokrinológián és immunhisztokémián át a génexpressziós mérésekig. Eredményei árnyaltan gazdagítják a téma szakirodalmát, köszönhetően eredeti megfigyelései és adatai gazdagságának.

A legfontosabbak e felismerések közül az alábbiak:

1. Idült fizikai és metabolikus stressz hím patkányok esetében hasonló POMC- és kortikoszteronemelkedést indukált di/+ és di/di genotípusú egyedekben.
2. Szoptató patkányokban di/+ genotípus esetében magasabb krónikus HHM tengely aktivitás mutatható ki (CRH mRNS, kortikoszteron, mellékvese súlya) di/di genotípusúakkal összevetve. A c-fos expresszió ebben a kísérletes elrendezésben fokozottabb volt di/di állatoknál az mPVN sejtjeiben.
3. Tizenkilenc akut stresszhelyzetből származó adatok alapján az AVP hiánya alacsonyabb ACTH szekrécióhoz vezetett, míg a kortikoszteron szekréciója változatlan volt. Genotípus tekintetében a di/di állatokban az ACTH és a kortikoszteron szekréciója is alacsonyabb volt.
4. A di/di állatok alacsonyabb oxytocin-specifikus festődést mutattak a n. supraopticus területén, amelyet az FST nem változtatott meg. FST hatására a plazma oxytocinszint emelkedett, ami a di/di állatokban a vizsgált időintervallumban nem normalizálódott.
5. Perinatális stressz esetében az AVP-hiány (di/di) kivédte az ACTH emelkedést, és kisebb kortikoszteron válasszal járt. Ezeket az eredményeket AVP antisavó és V1b antagonistá segítségével megerősítették.
6. Perinatális korban a kortikoszteronszint nem követte az ACTH változásokat. A katekolamin-válasz nem volt egyértelmű.
7. Felnőtt állatokban a hipoglikémiás stressz kortikoszteron-, 10 naposokban inkább aldoszteronválasszal társult.
8. A glükó- és mineralokortikoid receptor mRNS expressziója jelentős korfüggést mutatott a hippocampusban (felnőtt állatokban magasabb volt), de a genotípus (di/di) nem volt rá hatással, ellentétben a 11-béta-HSD2-vel (di/di állatokban magasabb, különösen a 10 napos egyedekben).
9. Fialat állatokban az AVP-hiány csökkentette az indometacin-indukálta gastricus ulcus mértékét, ám e csoportban magasabb volt a mortalitás (késleltetett intestinalis ulceratio).

10. FST tesztben a di/di állatok kevesebb lebegést mutattak, és a második napon végzett mérésekben az úszás fokozottnak bizonyult. Perifériás AVP adása diszkrét hatást gyakorolt a szorongással és depresszióval kapcsolatos viselkedési mutatókra, ám a viselkedés a di/di állatokban nem normalizálódott.
11. Az impulzivitásban genotípus-függő eltérés csak az anyaállatokban volt megfigyelhető, a hímekben nem: az AVP-hiányos anyák kisjutalom-preferenciája alacsonyabb volt, és kisebb volt az inadekvát válaszok növekedése is.
12. Az AVP-hiány alacsonyabb agresszív viselkedéssel társult felnőtt hím állatokban és szoptató anyákban, ami nem volt elmondható reprodukív tapasztalattal rendelkező egyedek esetében, akik alapban jelentősen agresszívbak voltak a felnőtt hímeknél.

Formai szempontból a szerző téziseit logikusan, érthetően és lényegre törően prezentálta, eleget téve az MTA doktori értekezések formai kritériumainak. Csupán három kritikai megjegyzésem lenne. Az ábrák sokszor zavaróan kicsik, olyannyira, hogy az a megértéssel is interferál. Az 1. és 2. táblázat angol nyelvű, és számos ábrához hasonlóan zavaróan kisbetűs. Az angol nyelvvel semmi gond sem lenne, de mivel a dolgozat magyarul íródott, a nyelvi heterogenitás sem szemantikailag, sem esztétikailag nem szerencsés. Végül az alfejezetek és bekezdések felosztása túlzóan bonyolult, a legkisebb egységek hét számjeggyel vannak felcímkézve.

Az alábbiakban a részletes tartalmi megjegyzéseimet és kérdéseimet a dolgozatban elfoglalt helyük sorrendjében ismertetem.

7. old.

A stresszorok meghatározásának és osztályozásának bemutatott rendszere nem a legmakulátlanabb. Példaként említhető, hogy a fertőzés nem fizikai, hanem biológiai stressz, a mozgáskorlátozás pedig nem primer kognitív, hanem fizikai stressz. Az sem világos, hogy a szerző pontosan mit ért a szisztémás vs. neurogén stressz dichotómiás rendszerén. Nagyon hiányoznak a kurrens irodalomban központi helyet elnyert szociális stresszorok (pl. agresszor CD-1 egerek). Végül említést érdemelt volna az újabb stresszkoncepciók, mint a szinaptikus és a viselkedési metaplaszticitás kérdése.

8. old.

Dallman és Aguilera elmélete, miszerint az AVP a HHM tengely fő hypothalamikus szabályozója, részletesebb és árnyaltabb megbeszélést érdemelt volna már itt, az értekezés kezdetén. Ahogy később arról több helyen szó esik, ma már a CRH-dominálta mechanizmusok egyértelműbben, erre a szerző egyes eredményei is utalnak. Nem világos viszont az ember és a rágcsálók közötti különbség (pl. emberben a parvocelluláris neuronokban nagyon kevés AVP termelődik).

17. old.

A szerző állítása szerint a glükó- és mineralokortikoidok szabadon képesek a sejtek membránján átdiffundálni. Ez egy tankönyvi adat, amelyet az értekezésben egy 1985-ös közlemény citációja támaszt alá. Az állítás azonban ma már nehezen tartható. Kiemelném a szteroidtranszporttal kapcsolatos újabb eredményeket, különös tekintettel a specifikus szabályozás alatt álló ABC transzporterek kérdésére.

Ugyanitt kissé elavult a glükokortikoid receptorok molekuláris szabályozásának tárgyalása. Nem esik szó a receptorinteraktrómról (pl. FKBP5, az SRC-család tagjai, ill. a recptorszignál kölcsönhatása az NF- κ B-val és a génexpressziós változásokkal).

19. old.

A szerző röviden érinti az anyai stressz hatását a magzat fejlődésére. A kérdés kapcsán rendelkezésünkre állnak újabb kulcsadatok is, különös tekintettel a humán agyi képzalkotási eredményekre. Ennek tükrében érdemes lett volna kitérni az állatkísérletes adatok transzlációs potenciáljára.

Ugyanitt felmerült, hogy az SHRP alatt az AVP a fő szabályozó, mely periódus alatt kisebb a stresszválasz. Nem került kifejtésre, hogy mindez az AVP élettani jelentőségét erősíti vagy gyengíti, illetve pontosan milyen hipotéziseket épített a szerző az SHRP jelenségére.

28. old.

Az AVP lehetséges jelentősége szorongásban és depresszióban ismert, ám a jelen tárgyalás némi kiegészítést igényel. Az értekezésben olvashatunk a V1b antagonistá SSR149415-ről, amelyről kiderült, hogy az ígéretes állatkísérletes eredmények ellenére nem hatásos generalizált szorongásos és major depresszív zavarban (Griebel G et al., J Clin Psychiatry, 2012;73:1403). 2008-ban a Sanofi-Aventis beszüntette a szerrel kapcsolatos vizsgálatokat.

30. old.

Félrevezető, hogy a 80-as években közölt két klinikai vizsgálat alapján az AVP hatásos szerként került ismertetésre a szkizofrénia pozitív, negatív és kognitív tüneteinek kezelésében. Már ekkor felmerültek kételyek: pusztán csekély javulást és jelentős elektrolitavart írtak le (Iager AC et al., Am J Psychiatry, 1986;143:375.). A szerző nem szólt ugyanakkor arról, hogy a V2 antagonisták képesek a szkizofréniahoz társuló potenciálisan súlyos hiponatrémia enyhítésére (Josiasen RC et al., Biol Psychiatry, 2008;64:1097). Újabban intranszalisán adott desmopressin jótékony hatását mutatták ki főleg a negatív tünetek esetében (Hosseini SM et al., Eur Neuropsychopharm, 2014;24:846.)

Végül megemlítendő, hogy a bevezető részből nagyon hiányzik az oxytocin ismertetése, a vonatkozó hipotézisek, pedig ezzel kapcsolatban méréseket is végeztek, igen érdekes eredményekkel.

Az elkövetkezőkben rátérek a módszertani résszel kapcsolatos kérdésekre.

37. old.

Mi indokolta az éter-stressz használatát? Milyen humán stresszhelyzet analógiájának felel meg? Az NMDA/kainát receptorokon ható szerekkel történő kezelés miért stressz? A stresszexpozióknak nem kitett állatokkal miért nem végeztek magatartásvizsgálatokat?

38. old.

A házilag gyártott U-alakú mikrodialízis-mintavevő működését hogyan validálták?

44. old.

Az agyterületek vizualizálásánál a 20-szoros nagyítással végzett digitalizációt alkalmaztak. Ez az eljárás elégséges felbontást biztosít? A pozitív elemek minimális méretét miért 20 pixelben határozták meg, és miért az adott felbontáson?

45. old.

A hippocampus feldolgozása után végzett qPCR számos kérdést felvet. Jól ismert, hogy a hippocampusban több al régió található eltérő cytoarchitektonikával, és az itt lévő sejtek génexpressziós profilja is különböző. Kérdéses, hogy ennek ismeretében milyen információt ad általánosságban, al régió és sejt típus-specifikáció nélkül mRNS kifejeződésről beszélni.

46-47. old.

A szorongás és a depresszió komplex fenotípussal rendelkezik. Ennek ellenére az állatkísérletes modellekben csupán egy-egy viselkedési paradigmát alkalmaztak, így számos jelenségkör lehetséges stressz- és genotípus-függése ismeretlen maradt.

A módszertani részt követően áttérek az eredmények értékelésére.

Az eredmények összességében áttekinthetően és logikusan kerültek bemutatásra, kiemelve a lényeges pontokat a rendkívül szerteágazó adathalmazokból. Hiányoznak viszont a statisztikai hatásméretre utaló paraméterek: csupán a p-értékeket ismertette a szerző, nem találunk F-, df- és d-értékeket.

61. old.

A 26. és 27. ábrán látható adatok ellentmondásosak két vizsgálat tekintetében: nem tisztázott, hogy az AVP hiánya önmagában is emelkedett kortikoszteronszintet okoz, vagy sem?

A di/+ és di/di állatok mellett miért nem alkalmaztak +/+ genotípusú állatokat is? A 30. ábrán (agyi aktivitás monitorozása c-fos pozitív sejtek meghatározásával) már +/+ kontrollok vannak. Ez több, más helyen is gondot okoz, és megnehezíti az egyes vizsgálatok összehasonlítását (lásd pl. CRH pozitivitás 29. és 32. ábra).

62. old.

A 29. ábrához kapcsolódva a szerző leszögezi, hogy a di/di állatok CRH mRNS szintje általában is alacsonyabb volt a di/+ genotípushoz képest. Az ábrán azonban ez a hatás nem látszik. Érdemes lenne kifejteni, hogy az „általában alacsonyabb” jelenség hátterében pontosan milyen statisztikai részletek állnak.

63. old.

A 6. táblázat szerint bizonyos stresszorok esetében különbséget figyeltek meg ACTH és kortikoszteron szekrécióban a di/di és di/+ állatok esetében. Mi magyarázza ezeket a különbségeket nagyon hasonló stresszorok esetében is (pl. szociális elkerülés és szociális kudarc)?

71. old.

A gyomorfekély és a mortalitás tekintetében nonintuitív eredmények születtek. Volt-e különbség a fekély lokalizációjában, mélységében és szövettani szerkezetében a kor és a genotípus függvényében? A dolgozatban csak a fekély területe szerepel.

72. old.

Depresszió, szorongás: Nem világos, hogy a perifériás DDAVP kezeléstől milyen hatást vártak, és milyen mechanizmust tételeztek fel e mögött.

Végül az értekezés diszkussziójára reflektálnék.

A szerző eredményei árnyalt és sokrétű továbbgondolást tesznek lehetővé. Ez a munkában jórészt meg is jelenik, de van néhány hiányzó pont. A nem egyértelmű eredményeket a továbbiakban tisztázni lehetne a központi idegrendszerre szelektív genetikai manipulációval. Példaként megemlíthető, hogy V1b knockout egérben lentivírussal a hippocampus CA2 régiójába juttatott receptorgén helyreállította az állatok támadó viselkedését a szorongással kapcsolatos jelenségek változatlansága mellett (Pagani JH et al., Mol Psychiatry, 2015;20:490).

Genetikailag módosított, mutáns állatokban bonyolult kompenzációs folyamatok alakulnak ki, így a megfigyelt változások - viselkedésbeli, élettani és morfológiai – sokszor e következményes jelenségekkel függhetnek össze, nem pedig az eredeti, körülírt és jól definiálható genetikai változással. Szükséges tehát az adott célmolekulához kapcsolódó interaktom vizsgálata, igénybe véve a bioinformatikai eszköztárát is.

Összefoglalva: dr. Zelena Dóra egy rendkívül impresszív, nemzetközileg is nagyon jó színvonalú, meggyőző és tiszteletre méltó doktori értekezést állított össze. A doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez, a nyilvános vita kitűzését javasolom.

Budapest, 2016. 08. 01.



Kéri Szabolcs