Bírálat

Maglóczky Zsófia
„A hippocampus gátló neuronhálózatainak átalakulása temporális lebeny eredetű epilepsziában” c.
MTA doktori értekezéséről.

A hippocampus kiemelkedő helyet foglalt el az agykutatásban az elmúlt 20 évben. A Web of Knowledge adatbázisban a hippocampus szó alatt csak a Neuroscience témakört vizsgálva 43 900 dolgozat és review jelent meg 1990 és 2010 között. Azért emeltem ki ezt az időszakot, mert erre esett Maglóczky Zsófia tevékenysége, aminek eredményeit az értekezésben összefoglalta. A nagyon régóta ismert epilepszia kórkép, a gyógyításában elért sikerek ellenére, ma is jelentős orvosi és társadalmi probléma, ezért minden olyan kutatás, aminek eredményeiből esetleg a gyógyítás is profitálhat, fontos és támogatandó. A klinikai kórkép mögött kóros, elektrofiziológiai módszerekkel elemezhető jelenségek állnak, amelyek okait az idegi szerkezet megváltozásában is kereshetjük. Az értekezés tárgya ezeknek a lehetséges elváltozásoknak a vizsgálata temporális epilepsziában szenvedő betegek műtéttel eltávolított hippocampusában.

Az értekezés másfeles sorközzel nyomtatva 188 oldal terjedelmű. 63 nagyrészt több képből álló fény- és elektronmikroszkópos ábrát és 23 táblázatot tartalmaz. Felépítése megfelel a formai előírásoknak.

A **Bevezetés**ben a hatalmas irodalmi anyagból kiemelte a legfontosabbakat. A forrásmunkák óriási számát tekintve ezt a megállapításomat arra alapozom, hogy a hivatkozott dolgozatok a szakterület nagy presztízsű folyóirataiban jelentek meg. A pályázó röviden ismerteti a temporális lebeny eredetű epilepsziát, az emberi hippocampus szerkezetét összehasonlítva majom és patkány hippocampussal, a vizsgált agyrész idegsejtjeinek funkcionális felosztását és az epilepsziában kialakuló sejtpusztulás általános jellemzőit.

Az értekezés **célkitűzései**t négy pontban foglalta össze. A hippocampus sejtjeinek morfológiáját, transzmittereit, neurokémiai sajátságait és működésüket az esetek többségében patkányokban, egerekben, részben majmokon vizsgálták normál állatokban vagy kísérletesen előidézett epilepsziában. Az emberi hippocampusra vonatkozó adatok azonban hiányosak, főleg epilepesziás kórképekben. Mivel az epilepsziás tünetek kialakulásában jelentős szerepet játszik a gátlósejtek kóros működése, a kutatásokban első helyen ezek funkcionális csoportosítása állt neurokémiai sajátságaik alapján. További cél volt annak vizsgálata, milyen összefüggés van a gátlósejtek epilepsziában észlelhető pusztulása és a szinaptikus reorganizáció között.

Az anyag és módszer fejezetben részletesen ismerteti a fixálásra használt eljárást. Emberi agyszövet fixálása csak post mortem lehet, ezért a fixálás minősége döntő jelentőségű. Az eredeti közlemények elektronmikroszkópos fotói bizonyítják, hogy a fixálás minőségére irányult erőfeszítések eredményesek voltak. A neurokémiai vizsgálatok immuncitokémiai módszerekkel történtek fény és elektronmikroszkópos szinten, egyszerű vagy kettős festéssel. Kettős fluoreszcens jelölést is alkalmaztak. Az alkalmazott módszerek korszerűek, alkalmasak a tervezett vizsgálatok elvégzésére. A dokumentációból megítélhető, hogy a készítmények jó minőségűek, egyenértékűek vagy jobbak neves külföldi szerzők közleményeiben láthatókkal. A szöveti készítményekben kimutatott neuronok és szinapszisok kvantitatív analízisét is elvégezte modern statisztikai programokat használva. Részletesen ismerteti a szinaptikus reorgnizáció vizsgálatára használt módszereket is. Az egyes sejttípusokat camera lucidával készült rajzokon is bemutatja, normál kontrollokhoz viszonyítva a kóros elváltozásokat. A rajzok esztétikusak, informatívak, jól mutatják a kóros elváltozásokat.

Az **eredmények** ismertetése teszi ki az értekezés valamivel több, mint 60%-át. A hippocampus epilepsziában észlelhető kóros elváltozásait négy típusba sorolja: enyhe, foltos,

szklerotikus és gliotikus. Az első kettőt néhány esetben nem szklerotikus típusként összevontan tárgyalja. Tumoros hippocampusokat és a kevés gliotikus anyagot kavantifikációra és EM analízisre nem használta. A hippocampus két régióját vizsgálta boncolt tetemekből származó normál kontroll és műtéttel eltávolított epilepsziás mintákban. Az egyik a gyrus dentatus, amely szerepet játszik az epileptogenezisben, de principális sejtjeinek (szemcse-sejtek) többsége nem pusztul el a betegségben. A másik az Ammon szarv CA1 régiója, ahol a legkifejezettebb a principális sejtek (piramis sejtek) pusztulása szklerotikus hippocampusban. A fő kérdés az volt, hogy milyen összefüggés van a serkentő működésű fősejtek pusztulása és három különböző gátlósejt fajta (periszomatikus, dendritikus és interneuron specifikus) elváltozásai között. A gátló interneuronokban 3 kalcium kötő fehérjét, parvalbumint (PV), calbindint (CB) és calretinint (CR) vizsgált. PV kizárólag gátló interneuronokban van, amelyek mindig tartalmaznak GABA-t is.

A **gyrus dentatus**ban csökkent a PV-immunreaktív (ir) sejtek száma a különböző súlyosságú epilepsziás esetekben. Szklerotikus hippocampusban nem voltak kimutathatók. A szemcsesejtek iniciális szegmentumain megnőtt a szimmetrikus szinapszisok száma, amelyek részben PV-ir axo-axonikus sejtek axonterminálisaihoz tartoznak.

Gátló kosársejtekben cholecystokinin (CCK) mutatható ki. Ezeknek a vizsgálatára idirekt megközelítést alkalmazott a pályázó. Munkacsoportjuk egyik vizsgálatában azt találták, hogy normál emberi hippocampusban az esetek 90 %-ban cannabinoid 1 (CB-1) receptor is jelen van. Technikai okokból ennek a receptornak az előfordulását keresték. Azt találták, hogy a CB-1-ir terminálisok szimmetrikus szinapszisokat képeztek főleg dendritekkel, és a szinapszisok számában nem volt különbség kontroll és epilepsziás mintákban. Fénymikorszkópos készítményekben nagyobb rostsűrűséget találtak a str. molecularebban. A 8. ábrán bemutatott DAB-os készítményen, az epilepsziás mintában az erősebb festődés háttérnek tűnik. Ez a használt denzitometriával félrevezető eredményt adhat.

Az interneuronok a hippocampus minden részében tartalmaznak calbindint, ami a gyrus dentatus szemcsesejtjeiben is kimutatható. Epilepsziában az interneuronok CB tartalma nem változik. A sejtek azonban jelentős morfológiai változásokat mutatnak. Megnagyobbodik a szoma, hosszabbak lesznek a dendritek és a sejt mindkét részén tüskék jelennek meg. A 63. oldalon az olvasható, hogy epilepiszában a szemcsesejtek szétvándorolnak. Ez aktív folyamatra utal. Ribak és mtsai (1998) astrocyta nyúlványok megszaporodását írták le a szemcsesejtek között és a sejtek diszperziójáról beszélnek, vagyis az astrocyta nyúlványok széttolják a szemcsesejteket. Kérdés: látott-e a pályázó astrocyta nyúlvány szaporulatot a szemcsesejtek között. Ha valóban szétvándorlásról van szó, akkor mi ennek a mechanizmusa?

Patkány hippocampusban kimutatták, hogy GABA-erg interneuronok között vannak substance P receptort kifejező sejtek is. A pályázó elsőként közölte, hogy a receptor emberi hippocampusban is megtalálható. A gyrus dentatusban az ilyen sejtek többsége a hilusban van. Szklerotikus hippocampusban csak néhány nagy sejtet láttak megváltozott morfológiájú dendritekkel, amiken a supramamillaris régióból érekező calretinin-ir axonok aszimmetrikus szinapszisokkal végződtek kontroll és szklerotikus mintákban is. Szimmetrikus szinapszisok CR-ir interneuronok axonjaihoz tartoznak és epilepsziában is megmaradnak.

A CA1 régióban axo-axonikus és kosársejtek PV-ir axonterminálisai sűrű fonatokat képeznek a piramis sejtek között. Gyakoriak az egymás mellett futó dendritek, amelyeket gap junction-ok kapcsolnak össze. Szklerotikus hippocampusban a piramis sejtek többsége elpusztult, alig található PV-ir interneuron. A sejtek száma foltos típusú elváltozásban is csökkent. PV-ir axonok ott is megmaradtak, ahol nem volt PV-ir neuron.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a PV-ir terminálisok nagy része piramis sejteken, kisebb részük interneuron dendriteken végződik. Csak a nem-szklerotikus hippocampusok CA1 régiójában voltak PV-ir terminálisok, amelyek többsége szimmetrikus szinapszisokat képez. A foltos típusú epilepsziás hippocampusban a piramis

sejtek szomáján kevesebb szinapszist találtak, mint a kontrollban és az enyhe típusúban. A piramis sejtek axon iniciális szegmentumain talált szinapszisok fele PV-ir volt kontroll és epilepsziás mintákban egyaránt.

Mások vizsgálataiból ismert, hogy calbindin a CA1 régió piramis sejtjeiben és az interneuronokban egyaránt előfordul. Epilepsziás hippocampusban a piramis sejtek nagy része elveszti CB pozitivitását. Az nterneuronok dendritfája eltorzul. A epilepsziás mintákban megnőtt a szimmetrikus szinapszisok hosszúságának aránya a teljes szinapszis hosszhoz viszonyítva. CB-ir terminálisok piramis sejteken végződtek, beleértve az axon iniciális szegmentumokat is. Feltételezik, hogy az ezeken végződő CB-ir terminálisok olyan axo-axonikus sejtekből erednek, amelyeket eddig még nem írtak le. A CB-ir terminálisok által beidegzett CB-ir dendritek száma és a szinapszisok hossza is megnövekedett szklerotikus hippocampusban.

Gátlósejtekre jellemző markerek (SOM, CCK, PV, CB) és SPR kettős immunfestést használva azt találták, hogy normál emberi hippocampusban nincsenek SPR pozitív ismert periszomatikus gátlósejtek. Feltételezi, hogy az SPR-ir sejtek egy része dendritikus gátlásban vesz részt. Szklerotikus hippocampusban, a CA1 régióban, számuk a kontroll érték felére csökkent.

Vizsgálták, hogy calretinin (CR) tartalmú sejtek részt vesznek-e az interneuron-szelektív gátlásban emberi hippocampusban. Kontroll és nem-szklerotikus hippocampusban CR-ir dendriteken CR-ir szimmetrikus szinapszisokat, az összefekvő dendritek között zonula adherenseket találtak. Feltételezik, hogy mindkét elem interneuronhoz tartozik. Piramis sejtek dendritjein CR-ir axonterminálisok aszimmetrikus szinapszisokat képeztek. A következő oldalon az áll, hogy piramis sejtek „messze túlnyomó többségében” a dendriteken nincs asszimetrikus szinapszis. Ez ellentétes az előző oldalon leírttal.

A jelölt vizsgálatai szerint epilepsziás betegek CA1 régiójában csökkent a CR-ir sejtek száma. Mások a sejtek megőrzését vagy számuk növekedését írták le 8-10 órás post mortem idejű kontrollokhoz viszonyítva. A jelölt 2-4 órás post mortem idejű kontrollokat használva bizonyította, hogy a CR-ir sejtek száma valóban csökken. EM vizsgálatokkal azt találta, hogy az epilepsziás betegek CA1 régiójában CR-ir terminálisok gyakrabban végződnek főleg nem CR-ir dendriteken, mint a kontrollban. A CR-ir dendritek degeneráció jeleit mutatják.

A **Megbeszélés**ben a jelölt röviden összefoglalja az eredményeket, összevetve azokat irodalmi adatokkal. Nem találtak egyértelmű összefüggést a sejtpusztulás mértéke és az epilepsziás állapot időtartama között. A sejtpusztulás okait irodalmi adatok alapján elemzi és a saját vizsgálati eredményeit is figyelembe véve arra a következtetésre jut, hogy epilepsziában az axon sarjadzás és a szinaptikus reorganizáció sokkal általánosabb jelenség, mint a sejtpusztulás, és önmagában is képes rohamokat generálni. Feltételezi, hogy a CR tartalmú sejtek megóvása az epilepszia korai fázisában megóvhatná a hálózatot a korai szinkronizációtól.

A **fontosabb új megfigyelések** az alábbiakban foglalhatók össze:

1./ A CB és CCK tartalmú interneuronok nem pusztulnak el a hippocampus gyrus dentatusában és a CA1 régióban epilepsziában, a CR tartalmúak viszont mindkét agyrészben érzékenyek.

2./ A gyrus dentatusban a periszomatikus gátlásban részt vevő PV tartalmú sejtek egy része megmarad epilepsziában. A szklerotikus CA1 régióban azonban a principális sejtekkel együtt elpusztulnak. A periszomatikus gátlósejtek sarjadzása miatt a szemcsesejteken több lesz a gátló végződés, mint kontrollban.

3./ Epilepsziás hippocampusban a CB tartalmú interneuronok nagyobb arányban létesítenek kapcsolatokat CB pozitív dendritekkel, mint kontrollban. A szinaptikus reorganizációt egy sémás rajz (63. ábra) segítségével mutatja be.

4./ Feltételezi, hogy a meggyengült dendritikus gátlás és a periszomatikus gátlás megerősödése növeli a principális sejtek szinkron tüzelésének lehetőségét.

Az értekezés szakmai tartalmának ismertetése után, annak formájával kapcsolatos megjegyzéseimet foglalom össze. A formai hibák többségét egy függelékben mellékeltem a bírálathoz. Itt soroltam fel számos kifejezést is, amit helytelennek tartok. Ezeket nem kívánom ismertetni, de szeretném felhívni rájuk a pályázó figyelmét. Annak tudatában, hogy hibátlan szöveget szinte lehetetlen készíteni, meg kell jegyeznem, hogy szokatlanul sok a gépelési hiba, ami gondos ellenőrzéssel javítható lett volna.

Kritikai megjegyzéseim egy része az ábrákra és a táblázatokra vonatkozik. A hisztológiai dokumentáció talán teljes egészében az eredeti közleményekből származik. Többségük minősége nem tér el lényegesen az eredetitől. Sok ábra mérete azonban kisebb, mint az eredetié, és ez főleg az elektronmikroszkópos képeknél minőségromlással járt, ami kontraszt csökkenést és esetenként a szinaptikus rés bezáródását okozta (11., 31., 37. ábra). A 10. ábra betűi a rossz nyomtatás és a kis méret miatt alig olvashatók. A 35. ábra helyén egy üres keret van. Nagyon zavaró, hogy a táblázatok egyharmada kettévágva, két oldalon jelenik meg. Ez a 4. és 5. táblázatnál a hosszuk miatt szükséges volt, az értelmezhetőség megkönnyítésére azonban a táblázat második felének oszlopainál is be kellett volna írni az oszlop címét (tartalmát). Ez a többi elvágott táblázatra is vonatkozik. A táblázatok többségében a szöveget 1,5-es sorközzel írták. Ha az 1., 19. és a 21. táblázat szövegét 1-es sorközzel írták volna, mindegyik elfért volna egy oldalon. Nem szerencsés megoldás, hogy az ábramagyarázatok többsége nem az ábrát tartalmazó oldalon, hanem egy oldallal előbbre van, gyakran úgy, hogy az oldal jelentős része üres. Ez megnehezíti az ábrák tanulmányozását. Az ábramagyarázatokat is jobb lett volna 1-es sorközzel írni.

Összefoglalóan megállapítható, hogy az emberi epilepsziában, a hippocampusban észlelhető morfológiai és neurokémiai elváltozásokról rendelkezésünkre álló ismeretek jelentős része Maglóczky Zsófia és munkatársai kutatásainak eredményei. Az adatok hitelesek, nemzetközi szinten is elismertek, amit bizonyít a több mint 350 hivatkozás azokra az értekezés tárgyát képező dolgozatokra, amelyekben a pályázó első vagy utolsó szerző.

A téma fontossága, az új adatok mennyisége, a szöveti készítmények minősége és az eredmények nemzetközi fogadtatása elégségesek az MTA doktora cím elnyeréséhez. Javaslom az értekezés megvitatását és a cím odaítélését.

Dr. Lázár Gyula
professor emeritus
az orvostudomány doktora

Pécs, 2013. február 15.