Opponensi vélemény

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

Az értekezés a szokásos formai előírásoknak megfelelően készült, szokásosan tagolt. Terjedelme 172 oldal és az ehhez csatlakozó 10 oldal referencia és a saját közlemények listája. Az értekezés, a szövegbe illesztve 63 ábrát és 23 táblázatot tartalmaz. Az ábrák és táblázatok gyakran teljes oldal terjedelműek, így ha azokat nem számozta volna be a szerző, a terjedelem 100 oldal alatt lenne, ezért a szöveg nem túlzottan terjedelmes. Az értekezés 14 saját közleményen alapszik, melyek közül 11-ben Maglóczky Zsófia első vagy utolsó szerző. Egy magyar nyelvű könyvfejezet kivételével, a közlemények jelentős nemzetközi folyóiratokban jelentek meg 1997 és 2011 között.

Nem akarok sok szót szaporítani az értekezés stílusára, írásmódjára és szerkesztésére vonatkozóan, mert ez az értekezés még egyszer már nem készülhet el, így nem korrigálható. De nem lehet szótlanul elmenni a betűelütések, szóismétlések, felesleges vagy hiányzó zárójelek garmadája mellett, mert túl sok van. Különösen a 70 és 90 oldalak között feltűnő a sok hiba, talán szerző itt volt a holtponton az értekezés írása során. Az ábráknál és táblázatoknál az a megoldás, hogy az ábramagyarázat rendszeresen az ábra előtt vagy az azt következő oldalon van, még hagyján, de hogy a táblázatok elvágva két oldalra kerüljenek ez már szerkesztési hiba. Az pedig, hogy az ábrának csak a kerete került az értekezésbe, már alacsonyabb tudományos fokozatért írt értekezésnél is erélyes szemöldök felvonást eredményezne.

A **Bevezetés** mértéktartóan rövid, a lényegre szorítkozik. A hippocampus struktúrájának általános leírása és bemutatása az 1. ábrán jó, de megjegyzem, hogy ilyen szintű munkánál még egy rajzot megért volna a CA1 és CA2 neuronok elkülönítése. Különösen sejt töltések esetén, ahol a környezet nem festett, ott az apikális dendrit jellemző bifurkációja a mellékágak megjelenése előtt a CA2 neuronok jellemzője, míg az ábrán is rajzolt CA1 neuronok mellékdendritjei azonnal megjelennek a stratum radiatumba kifutó apikális dendriten. Immunfestett metszeteken ez nem látszik, de a klasszikus leírások Golgi módszerrel (pl. Lorente de Nó. 1934) kiemelik ezt a különbséget.

A 12. oldal 7. sorában a Duvernoy (1998) hivatkozás egyáltalán nem releváns, ide egy neurológiai tankönyvi hivatkozás lett volna releváns (ha éppen kell). Ugyanitt és a későbbiek során is a Cornu Ammonis (a napistent, Amon Re-t, jelképező kos szarva, hiszen akármilyen szarv mégsem lehet az agyban !!) megérdemelte volna a nagy betűkkel írást, hiszen a CA 1-3 elnevezés innen adódik. Tudom, hogy angol irodalomban mindkét szót is szokták kis betűvel írni (cornu ammonis), de miért kell a rossz példát követni? Maga Lorente de Nó is nagy betűkkel írta le közleményében (1934), ahol a CA1-4 felosztást bevezeti. Amaral érdeme, hogy ezt CA1-3 és hilusra módosította 1978-ban megjelent közleményében (Amaral DG, 1978, JCN). Seress (1988) már csak elfogadta ezt a felosztást és a főemlős agyra is

alkalmazta, majomban és emberben is. Így a nevezéktan említésénél a Bevezetésben nem korrekt utóbbiakat egy sorban említeni Lorente de Nó-val. Külön fejtörést okozott számomra Maglóczky Zsófia kissé egyéni és túl közvetlennek tűnő idézési módja Lorente de Nó nevét illetően, „per" Nó-nak írva. Lorente de Nó 1990-ben meghalt, így David Amaral még személyesen beszélhetett vele, ezért is írja 1978-as közleményében, hogy „personal communication" útján tisztázta Lorente de Nóval egyes szakmai állításait! Más spanyol kutatók akik személyesen is ismerték, soha nem említik, vagy referálják a nevét másként mint Lorente vagy Lorente de Nó, de csupán Nó a spanyol szakmabeliek szerint teljesen értelmetlennek tűnik. Szerző nem lehetett olyan baráti viszonyban Lorente de Nóval, hogy egy teljesen egyéni megnevezést alkalmazzon. Miután a referencia jegyzékben is így szerepel (118. oldal) kénytelen vagyok szóvá tenni.

Nem értek egyet a CA3c és a hilus viszonyában a polymorph réteg elnevezés használatával. Duvernoy, az általa polymorph rétegnek nevezett struktúra alatt a szemcsesejtek alatt húzódó szubgranuláris réteget értette (lásd. Duvernoy 1988 Springer kiadás 19 oldal, 5B ábra) valószínű azért, mert Ramon y Cajal is használta erre a területre a polymorph réteg elnevezést. Viszont ők nem használták (mert nem is ismerhették) a gyrus dentatus vonatkozásában a hilus elnevezést. A polymorph réteg viszont semmiképpen nem szinonímája a CA3/c területnek. Az endfolium sclerosis-ban tehát a CA3c + a hilus sejtjei pusztulnak, de CA4+ polymorph réteg csupán a hilust jelenti, mert Lorente de Nó az Ammon szarv CA3 a,b,c területe mellett írta le a CA4 területét.

Úgy találtam, hogy az értekezésben a CA1 terület és az endfolium sclerosis is helyesen van ábrázolva és értelmezve, csak a klasszikus leírások említésénél szerző kissé belekeveredett a rétegekbe.

Egyes állítások mellé szerencsés lett volna több helyen referenciák megadása. Például a 20. oldalon a következő mondatnál, hogy „ míg a parvalbumin (PV) tartalmú interneuronokat munkánk megkezdése előtt egyesek (??) nagyon érzékenynek találták epilepsziára, míg mások (??) megőrződésről számoltak be. Itt pl. említhetném deFelippe 2007-ben megjelent közleményét ahol még az absztraktban is kiemelik, hogy a világon először ők írták le a parvalbumin tartalmazó neuronok megőrzöttségét epilepsziában (Andrioli et al., Neuroscience, 149, 131-41, 2007). Addig, amíg a Blümcke csoport munkáival szerző konfrontálódik, a parvalmumin tartalmú neuronokkal és a kosársejtekkel foglalkozó deFelippe és Sloviter féle csoportok eredményeit nem hasonlítja hasonló határozottsággal a saját eredményeihez. Ezt a Bevezetésben és a Megbeszélés fejezetekben is hiányolom és talán néhány mondat erejéig a szabad előadásba érdemes lenne belefűzni.

A **Célkitűzések**, világos és egyértelműen megfogalmazott pontokat tartalmaz. Az a cél, hogy elsősorban a GABAerg sejtekre koncentrálva próbálja az epilepsziás patológiai változásokat megközelíteni, az irodalomban azért egyéni, mert egyes gátló sejtcsoportok szerepével sokan foglalkoztak, de hogy a gátlósejtek sok csoportjának változásait együttesen tanulmányozzák, erre talán más munkacsoport nem is vállalkozott.

Az **Anyag és Módszer** fejezet precíz leírását adja az alkalmazott technikáknak. Az értekezés egyik pozitívan értékelendő pontja az emberi agyszövet struktúrájának jó megőrzésére készült protokoll, hiszen ez a morfológiai munka alapvető feltétele. A későbbi ábrák, az immunelektronmikroszkópos felvételek minősége bizonyítja, hogy a módszer jó. Öröm látni, hogy a Lenhossék program milyen lehetőségeket kínál az értékelhető kontroll emberi agyak felhasználásával. Különösen nagy értéket jelent az ultrastruktúra kiváló megőrzöttségét biztosító halál utáni és nem műtéti anyagok biztosítása. Szerencsés lehetőség, hogy szerzőnek módja volt e program keretében a megfelelő kontroll anyag elkészítésére. Ehhez azonban mindenképpen kellett egy innovatív módszermegújítás és az ezzel járó rengeteg munka.

Az **Eredmények** fejezetben a feldolgozott beteganyag meggyőzően nagyszámú esetet tartalmaz. Az epilepsziás elváltozások csoportosítása ellen nincs kifogásom, logikusnak tűnik a beosztás. Nyilvánvalóan ez a patológiai felosztás sem oldja meg az epilepsziás esetek csoportosítását, pláne nem az epilepszia okát illetően, hiszen a súlyosság és az időtartam szempontjából is jelentős átfedések vannak a csoportok között.

Az Eredmények fejezetben, a 47. oldalon a lap alján tett megállapítás hogy a „sejtek összáma kevesebb", úgy korrekt, hogy a fősejtek számához viszonyított gyakoriságuk kisebb. Sem majomban, sem emberben nem számolták meg a GABAerg sejtek abszolút számát a hippocampusban, vagy annak egyes részeiben. Egyetértek a megállapítással, amit a 6. Táblázat tartalmaz. Saját anyagunkban is azt találtuk, hogy a sclerosis előrehaladtával a PV-pozitív sejtek száma fokozatosan csökkent. Csak a Táblázat megtekintésekor válik érthetővé az a megállapítás, hogy „ Az axon iniciális szegmentumok gyakorisága megnőtt az epilepsziás gyrus dentatusban" . Nyilván nem erről van szó, hanem arról, hogy a PV-pozitív axon terminálisok gyakrabban alkotnak szinapszist axon iniciális szegmentummal.

Felvetődik a kérdés, hogy vajon az axo-axonikus sejtek rezisztensebbek lennének az epilepsziás károsodásra, mint a kosársejtek? Vagy esetleg a sprouting érvényes a kosársejtek axonjára is, és ezért van több szinapszis az axon iniciális szegmentumon, valamint tüskéken?

Mi az oka a négy illetve hatszoros szórásnak a PV immunreaktív axonterminálisok posztszinaptikus elemeinek gyakoriságában dendrit tüskéken (7. táblázat)? Kontrollban 2.2-12.2%, Epilepsziásban 4.2-16.4 %. Lehet, hogy PV-pozitív tüskeszinapszisok csak a dendrit egy bizonyos szakaszán vannak, ezért ha egy másik anyagban egy sejttesttől távolabb eső dendritszakaszt vizsgáltak akkor jóval kevesebb lett a szinapszisok száma? Az axon iniciális szegmentumon talált relatíve állandó érték ezt sugallja.

Lényegében a stiláris hibák egy szép példája a 67. oldalon a „hiláris CB-pozitív interneuronok *bemenete*.." Az elefánt bemegy az oroszlán barlangjába, de az afferens axon nem megy be a célsejtbe. Tudom, hogy ez bevett laboratóriumi zsargon, de nincs helye egy doktori értekezésben. A 11. ábra minősége gyenge. Talán a kicsinyítésből adódik, hogy az ábrázolandó részleteket inkább sejteni lehet, mint látni. Jobb a 12. ábra, de a D ábrán semmi nem utal arra, hogy ez egy moha terminális, még a mérete sem. Nem vonom kétségbe, hogy szerző azonosított moha terminálisokat a hiláris nagy CB-pozitív sejteken, ezért javasolom, hogy egy meggyőző ábrát mutasson az előadásban.

IV./3.2.2 fejezet: „Az SPR –t expresszáló sejtek általános jellemzői”

A fejezetben a 73. oldal 11-12. soraiban egy súlyos elírás ill. téves információ szerepel, a Substance P, vagy P-anyaggal kapcsolatban, amennyiben: „ Az agyban neurotranszmitterként és neuromodulátorként is funkcionál, töbnyire (sic) glutamáttal fordul elő, és serkenit (sic) az idegsejteket”. A P anyagról valóban feltételezték, sőt a perifférián bizonyították, hogy serkentő hatású neuromodulátor, de számos kísérleti állatban, valamint a majom (Seress és Léránth, 1996) és az ember (Del Fiacco és Quartu, 1989) hippocampuszában leírták, hogy P anyag kizárólag a GABAerg interneuronokban van és szimmetrikus szinapszisokban található meg. A szemcsesejtek, melyeknek transzmittere a glutamát tartalmaz GABA-t is majomban és emberben, de P anyagot nem. Lehet, hogy valahol az agyban van Substance P tartalmú glutamaterg sejt, de a hippocampuszban nincs, és a disszertáció a hippocampuszról szól. Az is nyilvánvaló, hogy a SPR jó szemmel észrevett markere a különböző GABAerg sejteknek, de nincs köze a Substance P tartalomhoz.

Az SPR tartalmú sejtek Substance P tartalmú sejtek által történő beidegzésének kimutatása valóban nem egyszerű feladat, mert az SP tartalmú sejteket és terminálisaikat leginkább csak acrolein fixálás után tudtuk kimutatni majomban is fény – és elektronmikroszkóppal (Seress és Léránth, 1996). Erre emberben nincs lehetőség. Így IV./3.2.2.4. fejezet címe félrevezető: „ Az SPR tartalmú sejtek SP tartalmú *bemenete*”, mert igazából az SP-t nem tudta szerző kimutatni. Amit itt leír, az a supramamilláris pálya epilepsziás reorganizációja, ami ugyancsak fontos információ. Miután a szupramamilláris pálya a hippocampus egyik fő szubkortikális bemenete ez legalább olyan fontos, mint egy sejtes elem számbeli és morfológiai változása.

IV./4 fejezet: Jól összefogott, világosan megírt fejezet, amelyben azonban a Táblázatok és ábrák szinte kivétel nélkül két oldalra kerültek, így állandóan ide-oda kellett lapozni, hogy konkrétan miről van szó. Ez nagyon zavaró volt.

A 98. oldalon szerző leírja, hogy PV-pozitív sejteken végződnek PV-pozitív axon terminálisok. Kérdésem, hogy PV-pozitív axon iniciális szegmentumon találtak-e PV-pozitív axon terminálist? A 28. ábrán kevesebb, több lett volna. Elég lett volna 1-1 példát bemutatni és nem kellett volna a közlemény ábrájához ragaszkodni. A 29. ábra sokkal jobb.

A 102. oldalon „PV immunfestett terminálisok célelemei” leírásában a citáció elé oda kellett volna tenni azt, hogy „hasonlóan ahhoz, ahogy Seress et al. korábban leírták”, mert a szöveget olvasva így úgy tűnik, hogy szerző nem saját megfigyeléseit írja le, hanem irodalmi adatokat ismertet, annak meg ilyen formában a Megbeszélés fejezetben lenne a helye.

Van egy számomra ellentmondásos adat a 13. és 15. Táblázatokban. A 13. Táblázat azt mutatja, hogy a PV-pozitív axon terminálisok szinaptikus célelemei között a kontrollban 14.5%-ban az epilepsziásban 28%-ban szerepel axon-iniciális szegmentum. A 15. Táblázat azt mutatja, hogy a CA1 piramissejtek axon iniciális szegmentumán hasonló arányban vannak

gátló szinapszisok és ezekből hasonló arányú a PV-pozitív terminális kontrollban és epilepsziásban. Akkor, a 13 Táblázatban látható kétszeres arányú növekedés miből adódik ? Elképzelhető, hogy a PV-pozitív axon terminálisok a nem piramissejtek axon iniciális szegmentumán végződnek nagyobb arányban?

Nem állhattam meg, hogy ne idézzem rossz példának a 110. oldalon olvasható megállapítást, miszerint a „ dendritek is sokkal hosszabban kifestődnek". Kifestőkönyvet ismerek, sőt néha hölgyek is nagyon kifestik magukat, de hogy a dendritek ezt hogy csinálják azt nem értem.

A disszertáció kétség kívül legattraktívabb ábrája, a 115. oldalon a 35. ábra, mert üres, ezért a fekete keretbe azt képzelhettem oda, amit akartam. Megkérem a szerzőt, az ábrát a szabad előadásban mutassa be, hacsak ez nem egy olyan teszt volt, amit annak idején diákcsínyként szoktunk disszertációkban emlegetni, hogy „aki idáig eljut kap egy láda sört", annak bizonyítására, hogy opponensek biztosan nem olvassák el a szöveget.

A 125. oldalon a 19. Táblázat számomra nem egyértelmű, mert a 41. ábra alapján nem ezt a következtetést vontam volna le. Úgy gondolom a fluoreszcensz kettős festéssel be kellett volna mutatni valamennyi lehetséges kolokalizációt és ehhez megadni azok gyakoriságát, majd levonni a következtetést. Negatív kolokalizáció bemutatása után nem szokás a kolokalizáció frekvenciájáról beszélni, mert bemutattuk, hogy nincs. Ennek ellenére világos, hogy az SPR-t expresszáló sejtek CB-t vagy SOM-ot tartalmaznak, tehát zömében axo-dendritikus sejtek. A fentiek alapján szerző 128. oldalon tett megállapítása is megkérdőjelezhető, nevezetesen, hogy miért biztos a szerző abban, hogy az SPR-pozitív sejtek között nincs kosársejt? Van rá 4% arányban lehetőség, hiszen az axon terminálisok azonosítására nem volt direkt lehetőség, viszont ilyen arányban kolokalizációt találtak PV-potitív neuronokkal.

Érdekes, és sokszor látott elváltozás epilepsziában vagy hypoxiában a dendritek gyöngyfüzér-szerű megjelenése, amit a 43 D, E, G ábrákon látunk. Az ultrastruktúra szintjén mivel korrelált ez az elváltozás? Hol van a befűződés, mi van a befűződött szakaszban és mi van a tágult szakaszban? Itt vannak a mitokondriumok, vagy itt végződnek axon terminálisok? A szklerotikus hippocampusban az alveusban illetve a stratum lacunosum-molekulárában mennyire lehetett megfigyelni axon terminálisokat? Gondolok arra, hogy a perforáns pálya axon terminálisai innerválhatnak, így életben tarthatnak GABAerg neuronokat a CA1 területén. A szklerotikus mintákban leírt tüskés dendriteken (48. ábra) talált aszimmetrikus szinapszisok arra utalnak, hogy az afferens pályák axonjainak egy része megmarad.

A CR tartalmú sejtek számát és arányát tekintve teljesen egyetértek a szerzővel. Tetszik a bizonyítás módja is. Saját epilepsziás műtétből származó szövettani anyagunkban is egyértelműen látszik a CR-tartalmú sejtek számának csökkenése. A Blümcke csoport eltérő megfigyelései nyilvánvaló módon a nem megfelelő kontroll használatából adódtak. Ez nem egyedi jelenség, deFelippe és munkatársai konkrétan leírják, hogy közleményeikben az epilepsziás elváltozások kontrolljaként epilepsziás anyagból származó szövetet használnak. Úgy gondolom a különböző érzékeny neuropeptidek kimutatását illetően kontroll és epilepsziás anyagban a téma tárgyalása megérné egy review elkészítését a szerző részéről.

A Megbeszélés fejezet mértéktartóan rövid, de kitér a legfontosabb kérdésekre. Az axon iniciális szegmentumon nagy számban található GABAerg terminálisok esetében nem teljesen osztom szerző véleményét abban a tekintetben, hogy amennyiben ezek izgató funkciójuak lennének, ahogy Tamás Gábor és munkatársai leírták, akkor egy ilyen tömegű kritikus helyen levő izgató szinapszis legalább annyira tudna szinkron izgalmi állapotot létrehozni, mint amennyire a Módi István elmélete szerinti tónusos gátló hatásuk alóli felszabadulás. De nyilván a funkció nem spekuláció, hanem bizonyítás kérdése, amihez az anatómia csak az alapokat adja meg.

Nem tudom megállni, hogy ne tegyek fel három átfogóbb kérdést:

1. Kérem, indokolja meg a szerző, felsorolva érveit amellett, hogy miért alkalmazza a proszubikulum terület önálló megkülönböztetését? Tudvalevő e terület elnevezése Lorente de Nó-tól származik (1934), de Amaral és munkatársai számos érvet hoznak fel amellett pl. a Hippocampus Book című könyvben, hogy a terület nem különálló egység és csupán arról van szó, hogy a subikulum ékszerűen elvékonyodik az oriens felé, míg a CA1 hasonlóképpen a molekuláris réteg felé és így a két terület egymásra csúszik. Magam híve vagyok e terület elkülönítésének, mert meggyőződésem, hogy az átmeneti területeknek vannak különleges jellemzői, melyek betegségekben jelentőséggel bírnak (mint pl. a transzentorhinalis kéreg Alzheimer kórban). Találtunk is, máshol nem létező NOS-pozitív piramissejteket, melyek más piramissejteket innerválnak, a szubikulum ezen területén patkányban, míg CART-pozitív piramissejteket ugyanitt emberben. Ezek egyenlőre sporadikus megfigyelések és ezek alapján nehéz védeni a proszubikulumot mint önálló területet. Várom a szerző érveit.

2. Mi a szerző elképzelése arról, hogy egy szklerotikus hippokampuszban, ahol praktikusan a CA1-3 piramissejtek hiányoznak, mi tartja fenn az izgalmi állapotot, ami ráadásul átterjed a kérgi területekre? Ha nem itt lenne a fókusz, akkor a műtéti eltávolításnak nem lenne értelme. Blokk rezekció esetében, amit pl. a Bakay féle iskola következetesen eltávolítanak minden temporális lebeny struktúrát, de pl. a pécsi gyakorlatban gyakran látjuk, hogy még a szubikulumot és entorhinális kérget is megkímélik, mégis van pozitív hatás az epilepsziás görcsök számát és súlyosságát illetően. Szerző nagyszámú műtétből származó szövettani anyagot dolgozott fel alaposan. Látott valami összefüggést a kiterjedtebb műtétek hatásosságát illetően?

3. Az előző kérdéshez kapcsolódva kérdezem, hogy mi a szerző elképzelése a szubikulum illetve az entorhinális kéreg szerepét illetően?

Összefoglalva:

Maglóczky Zsófia disszertációjában és a tézisekben alapos és pontos leírását adja a GABAerg neuronok morfológiai és szinaptikus átrendeződésének az epilepsziás emberi hippocampusban. A megállapításokat megfelelő számú és színvonalu tudományos közleményben tette közzé nemzetközi tudományos folyóiratokban. Megfigyelései alapjában leíró jellegűek, maga a disszertáció a leíró anatómia szép példája.

Kérdésfeltevése és munkája önálló, eredeti, ezzel hozzájárult a tudományos területe továbbfejlődéséhez, az epilepszia hátterében meghúzódó morfológiai változások leírásához. A disszertáció és a közlemények kétségtelenül hiteles adatokat tartalmaznak.

Mindezek alapján a nyilvános vita kitűzését és a mű (disszertáció és tézisek) elfogadását javasolom.

Pécs 2013 március 30.

Dr Seress László

egyetemi tanár

MTA doktora