

Válasz dr. Maglóczky Zsófia tudományos főmunkatársnak a

**„Neuropatológiai vizsgálatok neurokognitív zavarral járó betegségekben”**

című MTA Doktori Értekezésem bírálatára

Megtisztelve köszönöm, hogy elvállalta a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsa felkérését doktori értekezésem opponensi feladatainak ellátására.

Köszönöm alapos és konstruktív kritikai megjegyzéseit, kérdéseit, az értekezést és az annak alapjául szolgáló munkákat illető elismerő szavait.

Válaszaimat a bírálatban megfogalmazott és a válaszaim előtt dőlt betűvel jelzett kérdések, megjegyzések sorrendjében adom meg.

A bírálat bevezető részében írt véleményére reagálva megerősítem, hogy az eredmények – a téma és szakterületem jellegzetességei miatt is – együttműködések keretében valósulhattak meg. Ezekhez patológus és neuropatológus képzettségem, számottevő alapkutatói tapasztalatom révén járultam hozzá, érdemi jellegű saját munkával, kompetitív szakmai környezetben.

TARTALMI MEGJEGYZÉSEK:

- 1. Véleményem szerint a dolgozat nehezen olvasható és értelmezhető, mert a szerkezete rosszul követhető és elaprózott. A jelölt a dolgozathoz tartozó szinte minden cikkről (45, és a lazábban kapcsolódóakból is néhány) közül egy rövid összefoglaló leírást, de nem csoportosítja ezeket a megfelelő neurodegeneratív betegségek köré. Talán kevesebb részlet szerencsésebb lett volna, ha pld. a felsorolás mellett egyes, nem külföldön hanem pld. a saját csoportjában végzett vizsgálatot részletesen bemutat.*

Kihívást jelentett a szerteágazó témákat (morfológiai, klinikai, alapkutatói aspektusok, különböző betegségek) értekezés formájában koherens egészként bemutatni. A PhD-fokozat megszerzését követő több mint 15 évben születtek az értekezéshez hozzájáruló eredmények. Az ez idő alatt végzett (döntően betegellátó-klinikai és oktató) munkának nem célja, hanem következménye az MTA doktori pályázat. Több okból sem volt lehetséges, hogy – egy minél koherensebb jövőbeni MTA doktori művet szem előtt tartva – preferáljam az ebbe illő feladatokat a munkaköri köteleességek, elnyert pályázatok, magasabb szakmai prioritások által megkövetelt teendőkkel szemben.

Igyekeztem betegségek köré csoportosítani az eredményeket, amit a tartalomjegyzék is tükröz. Elismerem, hogy ez nem sikerült tökéletesen. Ennek oka részben az, hogy a vizsgálatok jelentős része több betegséget is magába foglal, mivel e munkák egyik fontos aspektusa a különböző betegségek összehasonlító elemzése volt.

Elfogadom a Bíráló megjegyzését, hogy talán szerencsésebb lett volna egyes vizsgálatokat részletesebben bemutatni, másokat pedig kihagyni.

2. *Hiányzik a metodika leírása, csak egy felsorolást kaptunk. Itt is örültem volna, ha a jelölt és csoportja által végzett metodikákat részletesebben leírják.*

A szerteágazó munka és az időtávlát nehezítette a részletes metodikai ismertetést. Ezért az értekezésben utaltam a közleményekre a releváns részeknél. A metodikai vonatkozásokat az értekezésben ott részleteztem jobban, ahol a módszer, illetve annak újszerűsége a vizsgálatnak nemcsak alapja és eszköze, hanem egyik jelentős eredménye is volt. Ilyen például az amiloid prekursor protein detektálása traumát rövid idővel követő halál esetén immunhisztokémiai módszerrel, vagy a FUS-fehérje elsőként történő kimutatása humán agyszövetben.

3. *Kevés az ábra, és nagyon rossz minőségűek. Van kivétel, de többségében a képek életlenek, túl kicsik, nem látni, mit szeretne mutatni a szerző, vagy nincsenek nyilak vagy felismerhetetlen pici objektumokra mutatnak. Az ábraszövegek is hiányosak, többnyire nincs mérce az ábrákon, de ha van, a szövegben nincs benne, hogy az mekkora, illetve hogy mire mutatnak a nyilak. A disszertáció olvasása közben többször felmerült bennem, hogy ezeket az ábrákat el is lehetett volna hagyni, mivel csak kevés egyértelműen azonosítható objektum van rajtuk. Az egész disszertáció könnyebben olvasható és sokkal érthetőbb lett volna számosabb, jó minőségű és nagyobb ábra bemutatásával.*

Valóban, több és jobb ábra emelte volna az értekezés színvonalát. Az értekezés eredeti (digitális) változatában jó felbontású és éles képek a nyomtatáskor sokat veszítettek minőségükből. Elfogadom azt is, hogy nagyobb ábrák többet megmutattak volna a morfológiai jellemzőkből. A nyomtatandó színes oldalak számát igyekeztem a kisebb ábrák révén csökkenteni. (Ezek a digitális változatban szintén jó minőségűek voltak). Még több nyíl, szám és értelmező magyarázat informatívabb lett volna. A 2, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15-ös ábra tartalmaz specifikusan megjelölt elemeket (azaz a 13 szövettani képből 8). Az ábraszövegek több esetben valóban lehettek volna részletesebben leíró és magyarázó jellegűek, noha a szövegtörzsben, ahol az ábrát hivatkozom, többségében szerepel további információ a mikroszkópos felvételek magyarázataként.

4. *87. oldal: „Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz korábban formalin (formicacid) előkezelést alkalmaztak, mely nem specifikus jelölődést nagyobb mértékben eredményezett.” A formicacid (nem világos, miért van angolul) hangyasav, és az nem azonos a formalinnal. Ha a formalin sokat áll, egy része lebomolhat hangyasavvá, de ez két különböző vegyület, a formalin a formaldehid vizes oldata.*

Egyetértek, formalin a helyes neve a szövetfixáló oldatnak.

5. *Maguk az eredmények nagyon jók, és rendkívül izgalmasak, és nagy örömmel olvastam volna pld. az Alzheimer-kór vagy demencia-formák köré csoportosuló eredményeket, nem cikk-specifikusan, többet megismerve a jelölt saját gondolataiból. A „Következtetések és új Megállapítások” fejezet a dolgozathoz hasonlóan túl részletes, nehezen áttekinthető, és nem a betegségek köré szerveződik, hanem az egyes cikkek eredményei köré épül. Ezért az egyébként láthatóan nagy munkával létrehozott, sok adatot tartalmazó disszertáció kisebb határfokkal közvetíti a benne leírt tömérdek információt, mint tehetné.*

Örömmel olvastam az elismerő szavakat az eredményekről, melyek megtisztelőek a témában jártas Bírálótól. Elfogadom, hogy az értekezés helyenként túl részletes, máshol inkább felsorolás jellegű – ennek kapcsán utalok a Bíráló 1. megjegyzésére adott válaszomra.

FORMAI KIFOGÁSOK:

1. *Összekeveredett oldalak, 23. után 29. jön, majd a 31. oldal után 24-28, és utána a 32. oldal*

Bizakodom, hogy ez a számos bekötött példány közül csak a Bírálónak elküldöttet érinti. Mivel a színes ábrákat tartalmazó oldalakat külön nyomtattam (színes nyomtatóval), ezen oldalak beillesztése egyenként történt, és ennek kapcsán hibáztam.

2. *Hiányos mondatok, zavaros fogalmazás, pld. 63. o. alja, utolsó 3 sor.*

Köszönöm a Bíráló kritikai megjegyzését. A specifikált mondatok ('Az eredmények tehát megerősítették a feltevést és hipotézist, hogy a TDP-43 az ubikvitinilált inklúziók (zárványok) része a TDP-43-proteinopátia csoportba tartozó ALS esetén. Ezen azonban nem kizárólagos, miként azt a munkánkban igazolt kivételek is igazolják.') azt hivatottak közvetíteni, hogy az ALS esetek közül nem valamennyi, hanem csak egy részük TDP-43 proteinopátia. Ez esetekben a TDP-43 jellegzetesen komponense a korábbi diagnosztikus neuropatológiai gyakorlatban immunhisztokémiailag csak anti-ubikvitin antitesttel jelölt zárványoknak, noha vannak kivételek is. Mindez ma már evidens tankönyvi adat, de a publikáció megjelenésekor – kevéssel a TDP-43 és ALS kapcsolatát leíró első közlemények után – érdemi és publikálható vizsgálati eredménynek számított.

3. *13. oldal: 7 fő proteinopátia csoportot sorol fel, a szövegben 6-ot mond*

Valóban, ez ellentmondás – hetet kellett volna írnom.

4. *angolos-magyaros helyesírás keveredik, pld. immunoreaktivitás 54. oldal. Magyarul immunreaktivitás lenne helyes. Vagy gliális sejt helyett gliasejt.*

Elfogadom a kritikát. Noha igyekeztem egységesen magyaros helyesírást használni, ez nem sikerült hibátlanul és maradéktalanul.

5. *83. o. teteje: fenilbutarát*

Köszönöm a javítást.

A DOLGOZATTAL KAPCSOLATOS KÉRDÉSEK:

1. *Post mortem idő és szöveti integritás: az 54. oldalon, 2. bekezd. alja: „Megjegyezzük, hogy a szöveti integritást jelző faktorok, úm. a szöveti pH és pm idő, érdemben nem befolyásolták az Optineurin immunoreaktivitást.” Valamint rövid részletet közöl erről a 85. oldalon, de ez inkább csak kiragadott példa. A szöveti integritást minden más betegség esetén is megvizsgálták, minden mintában, minden vizsgálathoz? Hogyan történt a szöveti pH mérés, a szöveti integritás mérés? Milyen vizsgálattal döntenek el, hogy a fehérjék/nukleinsavak vizsgálhatók-e az adott*

*mintában? Milyen tárolás szükséges ahhoz, hogy vizsgálhatók maradjanak? Ezeket az adatokat meg lehetett volna adni a Módszertan fejezetben, kérem a jelöltet, hogy most pótolja.*

Humán post-mortem szövetek neuropatológiai, proteomikai, genetikai vizsgálatok valóban felmerül az alapvető kérdés, hogy a halál után elkerülhetetlen bomlási folyamatok milyen módon és mértékben befolyásolják az eredményeket. A kérdést vizsgálták rágcsálókban (Fountoulakis M *et al.*, *Exp Neurology*, 2001, 167:86-94) és humán agyszövet vonatkozásában is (Hynd M *et al.*, *J Neurochemistry*, 2003, 85: 543-562; Lewis DA, *Neuropsychopharmacology*, 2002, 26: 143–154; Ferrer I *et al.*, *Cell Tissue Banking*, 2008, 9: 181-194; Crecelius A *et al.*, *Proteomics*, 2008, 8: 1276-1291). Ezen vizsgálatok eredményei mellett szólnak, hogy a legtöbb emberi idegrendszeri fehérje meglehetősen és meglepően ellenálló egyes post-mortem faktorokkal szemben, mint például a post-mortem idő (PMI) és tárolási hőmérséklet. Ugyanakkor egyes, anyagcserében és strukturálisan fontos proteinek hamar lebomlanak a halál után. Kísérleti munkáinkban igyekeztünk utánajárni a vizsgált fehérjék post-mortem degradációs érzékenységének. Például a 2011-es *Brain* cikkünkben, mely a nukleáris transzport fehérjékkel foglalkozik. Azt találtuk a szakirodalom átfogó elemzésével, hogy a CAS, karyopherin- $\alpha 2$ , és a többi nukleáris transzport fehérje sem gyors post-mortem degradációjú. Erre utal az is, hogy sem a kísérleti csoportok között, sem azokon belül nem mutatkozott az expressziós szint nagyfokú variabilitása. Továbbá igyekeztünk viszonylag alacsony PMI-s eseteket válogatni vizsgálatainkhoz.

Egy másik munkánkban (Whitfield *et al.*, *Neurobiol Aging*, 2014) a PMI az esetek egy részében meglehetősen hosszú volt, a pH-szövet viszont ez esetekben is a megfelelő tartományban volt. Azért is utalok erre a közleményre kiemelten, mert a kézirat bírálati fázisában erre a kérdésre részletesen ki kellett térnünk. Ekkor is hangsúlyoztuk, hogy a szöveti integritást jobban jelzi a pH, mint a PMI.

Egy friss publikáció is hangsúlyozza, hogy a megnyúlt PMI nem indokolja az ilyen minták automatikus kizárását a humán agyszövet alapú kutatásokból (Robinson AC *et al.*, *Acta Neuropathol*, 2016, 132:753–755). Vizsgálatainkban a minták meghatározó többségét illetően meglehetősen alacsony PMI, elfogadható szöveti pH, valamint a szigorú agybankolási, szövetfeldolgozási protokollok és standardok miatt eredményeinket bizonyára nem torzították szignifikáns mértékben a post-mortem degradációs folyamatok.

A 'housekeeping' gének (standard endogén kontrolllok) vizsgálata és az eredmények hozzájuk történő normalizálása jó módszer az RNS- integritás változékonyságából adódó hatások kiküszöbölésére. (Ezt alkalmaztuk is vizsgálatainkban). Amennyiben splicing analízis is történik, az izoforma ratio meghatározása is hasznos, ugyanis az RNS-integritás variabilitása esetén is a különböző izoformák közel egyenlő arányban érintettek.

A szövetminták mielőbbi és gyors fagyasztása  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra mind a nukleinsav- (DNS és RNS egyaránt), mind a fehérjevizsgálatoknál fontos. Ez esetben a nukleinsavak sok éven át használhatóak kutatásokhoz. Fontos megjegyezni, hogy a formalinban tárolt szövetmintákban a DNS idővel lebomlik, és például polimorfizmusok, SNP-k vizsgálatára nem megfelelő.

Az RNS-integritás jelzőszámát (RNA Integrity Number, RNI) az Agilent RNA 6000 Pico kit segítségével meghatároztuk meg Agilent Bionalyser műszerrel és szoftverrel, a gyártó előírásai szerint. A módszer röviden: az 'RNA picogel'-t centrifugálás után alikvotoltuk (65 $\mu$ l), és ehhez 1-1  $\mu$ l RNA 6000 pico dye festékkoncentrátumot adtunk, majd újabb centrifugálás után 1-1  $\mu$ l (3 ng/ $\mu$ l) izolált RNS-t adtunk ehhez a mintából, és egy 'RNS-létra' mintát is indítottunk. A chip az RNS-fragmentumokat méret szerint képes szeparálni, a festék pedig kötődik az RNS-hez. A detektorok előtt különböző sebességgel elhaladó festékrészecskék alapján a szoftver kiszámolja a riboszomális RNS-csúcsokat (28S és 18S). Normál körülmények között, ép RNS esetén, a 28S csúcs kétszerese a 18S csúcsnak. RNS-degradáció esetén ez változik és a szoftver 1-10 közötti értéket határoz meg RNS-integritástól függően (10-es az intakt RNS-hez tartozó érték). A 6.8-as RIN a leginkább elfogadott integritás-határérték, noha ettől lehetnek eltérések, például a tau esetében egyes vizsgálatokhoz 3.6-os szám feletti érték elfogadható lehet. Vizsgálatainkban ennek megfelelően jártunk el.

A fehérje post-mortem degradációjára utalhat a csökkent jel, például halványabb DAB kromogén festődés vagy immunfluoreszcens jelölődés; western blot esetén halványabb csík vagy degradációs artefaktum megjelenése. Ezért western blot esetén valamelyik stabil fehérje vizsgálata szükséges, mint 'loading control'.

A szöveti pH-t az agy felvágásakor – a fagyasztás, illetve percekkel a formalinban fixálás előtt – határoztuk meg a szövet gyors és egyszerű homogenizálása után, amely mikropisztillus segítségével történt laboratóriumi pH-mérővel, amit előzőleg pH 4.0 és pH 7.0-es törzsoldatokkal állítottunk be.

A szöveti integritást számos olyan pre- és post-mortem faktor befolyásolja, melyek hatással lehetnek a mért paraméterekre (fehérje- és RNS- szint, RNS hasítási/'splicing' mintázat, immunhisztokémiai jellemzők, stb.). Ezeket a szöveti integritást befolyásoló tényezőket két fő csoportba oszthatjuk (noha más csoportosítás is lehetséges): 1) A halál után ható tényezők, melyek befolyásolják a gének, ezek transzkriptumainak, illetve a fehérjék expresszióját és kimutathatóságát. Ezek közül kiemeljük a post-mortem időt. 2) A halál előtt ható tényezők, melyek közül az agonális időszak jellemzői játszanak fontos szerepet. Ilyen tényezők például a gliózis, az oxidatív stressz, a gyulladás, amelyek az általunk vizsgált neurodegeneratív és vaszkuláris kórképekben is jelentősek.

Az alábbiakban a post-mortem idő, az agonális állapot, a szöveti pH, RNS-integritás vonatkozásában hangsúlyozok néhány szempontot, melyek a Bíráló kérdéseire kapcsolódnak.

A post-mortem idő jelentősége a szöveti integritás vonatkozásában: A post-mortem idő a halál beállta és a szövet fagyasztása, illetve formalinos fixálása között eltelt időszakot jelenti. A hosszú PMI egyes gén-transzkriptumok, fehérjék degradációját, molekuláris szerkezetét (integritását) befolyásolhatja. Azonban számos tanulmány (több kvantifikációs módszert alkalmazva, mint pl. *in situ* hibridizáció, RT-PCR, microarray) azt igazolta, hogy a humán agykéregben az RNS-integritás, mRNS-szint és a PMI között nincs statisztikailag egyértelműen igazolható korreláció. Ezen eredmények azt valószínűsítik, hogy az RNS nagyfokú degradációja nem következik be a kezdeti post-mortem időszakban, amennyiben a szöveti integritás egyéb befolyásoló tényezői, mint pl. a pH és hőmérséklet megfelelő. Vizsgálatainkban arra

törekedtünk, hogy a kontroll- és betegcsoportok ne csak az életkor, hanem a PMI vonatkozásában is statisztikailag hasonlóak legyenek, ugyanakkor a PMI minél rövidebb legyen. Általában 3 és 120 óra között változott a PMI, a hosszú post-mortem idejű esetek azonban kis számban szerepeltek. Például a tau expresszió a kontroll és az Alzheimer kóros agyak a vizsgált régióiban stabil és hasonló szintet mutattak. (Niblock M *et al.*, *Neurobiol Aging*, 2016) Ez az eredmény egyébként összhangban van mások eredményeivel, miszerint a *MAPT*( tau gén) RNS-szint nem változott nagyszámú humán agyszövetmintán vizsgálva, noha a PMI 50 óra körüli volt. (Trabzuni D *et al.*, *J Neurochem*, 2011, 119: 275-282.) Kiemeljük azt a vizsgálatot, amit a BrainNet Europe Consortium szervezésében végeztek, és a középső frontális tekervény, *corpus callosum*, talamusz, cerebellum mintáit vizsgálták 193 agyból (Durrenberger PF *et al.*, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010,69: 70-81.). Ez az átfogó munka nem igazolt kapcsolatot a PMI és az RNS- integritás között. Megjegyezzük, hogy ez a tanulmány 2 napnál (48 óra) rövidebb PMI-s eseteket vizsgált. A meglepően nagymértékű post-mortem RNS stabilitásnak számos oka lehet. Például az, hogy az RNS-lebomlás nagy energiaigényű, és halál után a szövetek energiaellátottsága gyorsan lecsökken. Továbbá, lehetséges, hogy az RNáz inhibitorok hosszabban és nagyobb mennyiségben perzisztálnak aktív állapotban a halál után, mint az RNáz-ok. Az is lehetséges, hogy az RNS kevésbé érzékeny RNáz-okra, amikor a post-mortem agyban a transláció már nem zajlik (Barton AJ *et al.*, *J Neurochem*, 1993, 61: 1-11.). Ezek alapján feltételezhető, hogy a PMI az RNS-integritás és transzkriptum szint vonatkozásában nem játszik kiemelkedően fontos szerepet.

Agonális állapot és szöveti pH: Az agonális faktorok különböző kórélettani állapotok összességének és egymásra hatásának a következményei (például hipoxia, magas láz, epilepsziás jellegű roham, az agónia idejének elhúzódása). Az agonális faktorok száma negatív korrelációt mutat az RNS-expresszióval, RNS-integritással, vagy mindkettővel (Durrenberger PF *et al.*, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, 69: 70-81). Hardy és munkatársai (*J Neural Transmission*, 1985, 61: 253-264) négyponos skálát alkalmazva igazolták, hogy 1.) a gyors halál (akár erőszakos, akár természetes) magasabb agyi pH-val jár, mint a lassan bekövetkező halál; 2.) az elnyújtott terminális (agonális) fázis magasabb tejsav-koncentrációval jár, ami acidózist okoz. A hipoxia indukálta faktor 1 (HIF-1 $\alpha$ ) lényegesen magasabb olyan betegek agyszövetében, akik szövődményes agonális fázis után haltak meg, például kóma, légúti betegség, hosszan tartó gépi lélegeztetés esetén.(Durrenberger *et al.*, 2010)

Ezek az eredmények igazolják, hogy az alacsony pH hipoxiás állapotokkal korrelál (Durrenberger *et al.*, 2010), továbbá, hogy az alacsony agyi pH csökkent RNS- integritással jár, ami azt is magyarázza, hogy a szövődményes ('komplex') agonális fázis után meghalt betegek esetében miért találtak alacsonyabb RNS-szintet.

Azt is meg kell jegyeznünk, hogy nem minden vizsgálat talált összefüggést az RNS-integritás és szöveti pH között (Sherwood KR *et al.*, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37: 633-642). Megemlítendő továbbá az agonális faktorok kvantifikálásának nehézsége is. Például a hipoxia és dehidráció gyakran a klinikai betegdokumentáció alapján kerül értékelésre, noha ezek a feljegyzések gyakran nem szolgálnak pontos adatokkal az agonális faktorok súlyossága és időtartama vonatkozásában. Az 5.9-es pH-t tartják a szöveti integritás kritikus szintjének,

az ennél alacsonyabb pH esetén várható nagyfokú RNS-, illetve fehérje- integritás-csökkenés. Tanulmányainkban, ahol a szöveti pH-t vizsgáltuk, ilyen esetek csak elvétve fordultak elő. Például Niblock és munkatársai (Neurobiol Aging, 2016) vizsgálatában a nagyszámú minta közül csupán egyetlen ilyen eset volt. Az RNS-integritás jelzőszámát (RIN, 'RNA Integrity Number') szintén meghatároztuk és csak a határérték fölötti eseteket vizsgáltuk.

Egyéb változók is hatással lehetnek a szöveti integritásra, mint például a fagyasztási/felolvasztási ciklusok száma. Ezért a legújabb agybankolási irányelvek szerint az agyszövet fagyasztásakor több, kisebb méretű mintát javasolt  $-78-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolni műanyag zacskóban vagy egyéb tárolóban, például Eppendorf-csőben.

Megemlítendő az is, hogy egyes fehérjék vonatkozásában a beteg gyógyszerei is befolyásolhatják a post-mortem szöveti integritás csökkenésének mértékét és dinamikáját.

Összességében, fontos szempont, hogy a kontroll- és a betegcsoportok mintái lehetőleg rövid post-mortem idővel, minél inkább fiziológias pH- és RIN-értékkel rendelkezzenek, és e faktorok vonatkozásában (is) hasonlóak legyenek a csoportok.

*2. Noha a szerző leírja, hogy több cikkben is patológus szakértőként szerepelt, nem ír arról, hogy milyen kiválasztási kritériumokkal, feldolgozási feladatokkal járt a minták összegyűjtése. Felkérem, hogy pótolja, és mutassa be, milyen kiválasztási kritériumokat használtak az egyes mintákra, milyen etikai követelményeknek kellett megfelelni, milyen adatokat – a betegről és a betegségről - vontak be az egyes vizsgálatokba?*

A humán post-mortem agyszöveten alapuló kutatások alapja a beteg alapos klinikai kivizsgálása, a vizsgálati eredményeknek megfelelő dokumentálása. Ez – többek között – tartalmazza a kórtörténetet, családi anamnézist, genetikai és biomarker adatokat, az élő beteg neuropatológiai vonatkozású szövettani feldolgozásának és a képalkotós vizsgálatoknak az eredményeit. (Az értekezés 1. ábrája ilyen adatokat tartalmaz.)

Mindezek szükségesek a klinikopatológiai értékeléshez és egy adott vizsgálat vonatkozásában a betegcsoportok összeállításához, az esetek kiválogatásához. Az agybankolás is neuropatológusi tevékenység, szakasszisztensi segédlettel – ekkor nagyszámú paraffinba ágyazandó, illetve  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolandó szövetminta kimetszése történik az irányelvek szerint, az eset egyedi sajátosságait is figyelembe véve, például az elváltozások neuroanatómiai eloszlását, járulékos eltéréseket. A kutatási projektben vizsgálandó agyi régiók kiválasztása, a fehérjedetektálás módszerének (pl. immunhisztokémia, western blot) meghatározása, pontosítása is a neuropatológus iránymutatása vagy legalábbis konzulensi véleménye alapján történik, például hogy mi legyen a kromogén, milyen kettős jelölések lehetnek hasznosak és kivitelezhetőek.

Elsősorban a speciális neuropatológiai tapasztalatot igénylő munkafázisok (pl. a szövettani metszetek értékelése) vonatkozásában szintén fontos teendő az eredmények kiértékelése. A hibák azonosítása, kiküszöbölése ('troubleshooting') is ide sorolható. A neuropatológiai, szöveti alapú molekuláris eredmények klinikai korrelátumai, összefüggései is a neuropatológus, ideális esetben a neurológus, pszichiáter klinikussal és képalkotós szakemberrel együtt történő közreműködését igénylik. A képi dokumentáció, a közleményekhez az ábrák elkészítése is szokásos neuropatológus tevékenység. A

betegválogatásnak, az anonimitás megőrzésének és a kutatás etikai standardjainak is a neuropatológus az egyik őre. Ennek része az etikai engedély szövegezése és a bürokrácia útvesztőin való segítése.

*3. Milyen kéregtípusban találtak CB1 receptor eltérést Alzheimer-kórban? Vizsgálták a hippocampust is? Minden vizsgált betegben jelen voltak az elváltozások minden területen?*

Mivel ez a munka nem szerepel az értekezés alapjául szolgáló közlemények között, az eredmények részletesebb ismertetése nincs az értekezésben. Az eredményekre a Megbeszélés fejezetben utalok, a szinaptikus diszfunkcióval foglalkozó és az értekezés alapjául szolgáló publikációk diszkusziójának részeként.

A hippocampuszt tartalmazó kimetszésben – amely az értekezés 2-es ábráján 3-as számmal jelölt – vizsgáltuk a humán agyi mintákat. A szövetblokk (és metszetek) a *cornu Ammonis* (CA) 1-4-es területeit, a preszubikulum, szubikulum, a parahippokampális tekervényt valamint a kollaterális árok másik oldalán a fuziform tekervény részletét tartalmazza. Az immunfluoreszcens többes jelöléssel a CB1-receptor expressziót Alzheimer kór különböző súlyossági fokozataiban vizsgáltuk. Annak eloszlása Alzheimer kórban nem mutatott különbséget a hasonló életkorú, neurokognitív szempontból egészséges, Alzheimer kór típusú elváltozásokat nem mutató személyek mintáival összehasonlítva.

A CB1- receptor preszinaptikusan mutatkozott a preszinaptikus marker szinaptofizin fehérjével jelölt szegmenseken, valamennyi demens és nem demens személy hippocampális mintájában. Érdekes és új felismerése ennek a vizsgálatnak, hogy a 2-arachidonoyl-glicerol (2-AG), amely endokannabinoid molekula posztzinaptikusan termelődik, onnan kerül a szinaptikus térbe, és a CB1- receptorok aktiválásán keresztül képes a neurotranszmissziót szabályozni. Szintén fontos, hogy a CB1-pozitív preszinapszisok béta-amiloid tartalmú szenilis plakkokat vesznek körül, és itt jelentős mikroglia-akkumuláció is létrejön. A mikroglia pedig 2-AG bontó enzimeket termel.

Ugyanakkor a hiperfoszforilált tau-pozitív neurofibrilláris kötegeket tartalmazó neuronok szinaptikus kannabinoid szintet reguláló enzimjeinek szintje is változik. Az összetett és egymásra ható mechanizmusok eredőjeként a 2-AG-mediált endokannabinoid szignalizáció az Alzheimer- kórban megváltozik, elsősorban a szenilis plakkok környezetében. Ez valószínűleg eltérő módon történik, mint a másik fő endokannabinoid, az anandamine vonatkozásában, ami hozzájárulhat az Alzheimer- kórra jellemző szinaptikus diszfunkcióhoz. Érdekes mai relevanciája ennek a közel 10 évvel ezelőtti vizsgálatnak a közelmúltban publikált eredmény: a kannabinoid rendszer csekély mértékű aktiválása javítja a kognitív funkciót az idősödő agyban, azonban a fiatalok agyában nem (Bilkei-Gorzo *et al.*, Nat Med, 2017, in press, doi:10.1038/nm.4311).

*4. Az Alzheimer kórban és egyéb demencia kórképekben is felmerül a gliák kóros elváltozása, vasculárisdemenciában a vér-agy gát károsodása, AD-ben az ARTAG. Mondható-e, hogy ezeknél a neurodegeneratív kórképeknél a gliakárosodás esszenciális, mindig előfordul? Mondaná-e a jelölt, hogy a gliák károsodnak előbb, és csak ezután/ennek következtében a neuronok? Tapasztalatai alapján lehetségesnek tartja-e, hogy a neurodegeneratív kórképek*



– az összes, nem csak a demenciák – elsődlegesen gliális funkciózavarral járnak, és a neuronális károsodás másodlagos?

Ez nagyon izgalmas kérdés. Ha igen a válasz, akkor pedig mely gliasejt-típusok a „kórokozók”? A kamrarendszert bélelő gliális endipendima érdemben nem jön szóba, mint fontos szereplő, marad tehát az asztrocita, oligodendroglia (a két „makroglia-típus”) és a mikroglia. Egyre több adat szól amellett, hogy a nyugalmi (‘resting’) mikroglia aktiváció (például szisztémás gyulladás miatt) asztrocita aktivációt is okoz, azaz a nyugvó asztrocita reaktív asztrocitává alakul. Pontosabban, a kétféle reaktív asztrocita-típus közül a neurotoxikus A1 asztrocita jön létre (Liddel SA *et al.*, *Nature*, 2017,541:481-487). Ez a szinapszisokat is károsítja, és Alzheimer-kórban a súlyosan érintett prefrontális kéregben nagy számban megjelenik, továbbá oligodendroglia-pusztulást is okoz. Megemlítjük, hogy a gyulladás kiváltotta mikroglia aktiváció experimentális modellje az LPS kiváltotta gyulladás, aminek kapcsán a perifériáról is jutnak a vér-agy gáton keresztül az idegrendszerbe mikrogliaivá alakuló makrofágok és mieloid prekursor sejtek.

A másik reaktív asztrocita-típus az A2, amit oxigénhiány indukál, például stroke esetén, és a létükben fenyegetett neuronok túlélését segíti trofikus faktorok termelése révén, elsősorban a penumbra zónában és környezetében. Stroke esetén azonban lokális gyulladásos folyamatok is aktiválódnak, főleg akkor, ha szisztémás gyulladás is fennáll, például bronchopneumonia vagy súlyosabb esetben szepszis kapcsán.

Kérdés, hogy az asztrocita-aktiváló mikroglialis stimulus a neurodegeneráció oka vagy következménye. Noha az oki tényező mellett is sok minden szól – a fentiekből is következően –, kétségtelül igaz, hogy a pusztuló sejtekből szabadra váló kóros fehérje- aggregátumok vagy az extracellulárisan lerakódó béta-amiloid önmagában is képes mikroglia aktivációra. Ez beindíthatja, pontosabban fenntarthatja a *circulus vitiosus*-ként a neuronok citotoxikus környezetét.

Másrészt, mint azt a genetikailag determinált neurodegeneratív betegségtípusok) igazolják, az intracelluláris kóros fehérjeaggregációt eredményező mutációk megállíthatatlanul neurodegenerációt okoznak. Ezt érdemben nem változtatja meg a mikroglia és asztrocita reakció farmakológiai vagy egyéb befolyásolása sem. Ez azonban nem mond annak ellent, hogy e folyamatok hatása a neurodegeneráció egyik, bár önmagában nem kuratív kezelési módja lehet.

A kérdés e keretek között sem zárható le igen/nem egyértelműséggel, ugyanis a probléma komplexitása több kérdést generál, mint amennyit a diszkusszió megválaszolhat. Például friss adat, hogy a szelektív mikroglialis TDP-43-depléción elősegíti az amiloid mikroglialis fagocitózissal történő eltávolítását Alzheimer kór egérmodellben. Viszont drasztikus szinapsziskárosodást és -vesztést okoz, még béta amiloid hiányában is (Paolicelli RC *et al.*, *Neuron*, 2017, *in press*, doi:10.1016/j.neuron.2017.05.037.). Nem véletlen, hogy a mikroglialis reakciót és aktiválódást Janus-arcú jelenségnek tartják. Ez igaz az asztrocita reakcióra is, amint ezt fentebb diszkutáltam. Ez pedig sokkal bonyolultabb, mint amit az M1 proinflammatorikus (neurotoxikus) és M2 antiinflammatorikus (neuroprotektív) csoportosítás sugall.

Noha az oligodendroglia is szerepet játszik neurodegeneratív betegségekben és zárványok is kialakulhatnak citoplazmájukban, típusosan multiszisztémás atrófia (MSA), progresszív szupranukleáris bénulás (PSP) és ALS esetén (azaz alfa-szinuklein, tau, TDP-43 és FUS proteinopátiában egyaránt), szerepük kevésbé tűnik relevánsnak a neuronpusztulásban, mint az asztrociták és a mikroglia vonatkozásában. A mechanizmus nemcsak a mielin-károsodáshoz kapcsolódó axonális sérülékenységre és következményes idegsejtpusztulásra lehet, hanem az oligodendroglialis eredetű vastartalmú ferritin indukálta sejthalál ('ferroptosis'), valamint az oxigén szabadgyökök indukálta apoptózis és a makrofágokba jutva azok citotoxikus potenciáljának fokozása. Ismeretes, hogy Alzheimer-kór esetén az oligodendroglia fel szabaduló vas elősegíti a béta-amiloid oligomerek kialakulását az extracelluláris térben, és fokozza azok toxicitását (Liu *et al.*, J Biol Chem, 2011, 286: 4248-4256).

A neuronok és gliasejtek kölcsönhatása igazolja a régi feltevést, hogy az idegsejtpusztulás ALS és egyéb neurodegeneratív betegségek esetén nem sejt-autonóm ('non cell-autonomous').

E kérdés kapcsán említhető, hogy a neurodegeneratív proteinopátiák prion-szerű terjedés hipotézisének fontos eleme a kóros fehérjéknek a neuron és gliasejtek közötti (szinaptikus és közvetlen) kölcsönhatáson alapuló propagációja.

*5. Az iszkémia és a neuroprotekciónak vizsgálatához: úgy tudom, az is problémát jelent emberi esetekben, hogy az őssejtekből újonnan képződő sejtek sokkal kevesebben vannak, mint állatkísérletes modellben, és nagyrészt gliák. Ráadásul hamar el is pusztulnak. Nem lehetséges-e, hogy a DNS szénizotóp-koncentráció mérések azért hoztak negatív eredményt a sejt képződés szempontjából a sztrókos betegekben, mert a keletkezett sejtek már meghaltak a mérés idejére?*

Három naptól 13 évig terjedő post-stroke időszakot vizsgáltunk, és sem a korai, sem a krónikus stroke esetében nem igazolódott neurogenesisre utaló radiokarbon-beépülés a neuronális DNS-be, azaz valamennyi neuron az életkorral megegyező korúnak bizonyult. Mivel hosszú post-stroke időintervallumot fed le a vizsgálat, kijelenthető, hogy az iszkémiás stroke nem indukál számottevő neurogenesiset.

Köszönöm építő kritikai megjegyzéseit, megtisztelő értékelését és támogatását az értekezés nyilvános vitára tűzését illetően. Bízom benne, hogy opponensi véleményére adott válaszaim kielégítőek.

Debrecen, 2017. július 15.

Hortobágyi Tibor