

BIRÁLAT DR. HORTOBÁGYI TIBOR "NEUROPATOLÓGIAI VIZSGÁLATOK NEUROKOGNITÍV ZAVARRAL JÁRÓ BETEGSÉGEKBEN" CÍMŰ AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉSÉRŐL.

Rendkívül nagy munkát próbál bemutatni a szerző. A disszertáció alapjául szolgáló munka értékes. A post-mortális szövetet igyekszik olyan szempontok szerint vizsgálni, melyekből következtetni lehet az élőben lezajlott történésekre. Abban az esetben, ha ez nem lehetséges, transzgenikus állatmodellek, szövet kultúrák vizsgálatát vonták be, melyekből próbálták következtetni a humán történésekre. A nagyszámú kooperáció biztosítja az interdiszciplináris megközelítést, az eredményesebb kutató munkát. A jelöltet a világ élvonalában lévő kutatók alkalmas partnernek gondolják és igénybe veszik a szakértelmét. Ez a kooperáció tette lehetővé azt a magas színvonalú munkát, melyek a scientometriai indexek alapján is kiemelkedő minőségűek és mennyiségűek. A nemzetközi folyóiratokban társszerzőkkel megjelent 118 dolgozat összesített impact factora 480. A dolgozat alapjául szolgáló, általa megadott nemzetközi folyóiratban megjelent 3 közleményben első szerző, egy magyar nyelvű Idegyógyászati Szemle közleményben utolsó szerző. Ez azonban az inclusiós testes myositisről szól, így nem is értem miért került a disszertációba. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények között van egy 20 szerzős, egy 26 szerzős, egy 33 szerzős BrainNet Europe Consortium állásfoglalás, és egy több, mint 70 szerzős közlemény. Ezekben megállapíthatatlan a szerző tartalmi hozzájárulásának a mértéke. Ezt maga is megemlíti és elfogadom a megjegyzését, hogy a meghívás hasonló szervezetekbe önmagában pozitív értékelés. Ezen kívül még megad a doktori értekezés témaköréhez tartozó és ahhoz nem szorosan tartozó közleményeket: könyv fejezeteket, magyar nyelvű közleményeket, nemzetközi és nemzeti folyóiratokban megjelent közleményeket (pl. Slovenian Medical Journal, Neurology India) változatos témákban összesen 135-öt, melyeket elolvasni is sok, nemhogy megírni. A szerző rendkívül szerteágazó témákkal foglalkozott, melyek nagyobb részét a "Neuropatológiai vizsgálatok neurokognitív zavarral járó betegségekben" címmel foglalja össze az értekezésben. Van azonban ebben is olyan téma, melyben nincs kognitív zavar, vagy nem az a betegség lényege (pl. FUS-ALS, acut traumás agykárosodás.). Saját, új módszert nem fejlesztett ki. Viszont nagyszerűen tudott más tudományágakat bevonni és integrálni a kísérletes és a humán neuropatológiával. A neuropatológia ezekkel az új módszerekkel együtt tud visszajutni arra a kiemelt helyre, melyet a XIX. század végén és a XX. század elején elfoglalt a neurológiai diagnosztikában és a kutatásban. Az ilyen fajta együttműködések nagyszerű példái az integratív tudomány fejlődésének. Ennek a felismerése és alkalmazása már a dolgozatok számának és impakt faktoroknak, citációknak figyelembevétele nélkül is nagy értéke a jelölt tevékenységének.

A tartalmi bőség láthatóan a disszertáció szerkezetét megzavarja. Az eredmények és a megbeszélés összevont, mely teljesen szokatlan egy tudományos dolgozatban. Ezt a kettőt szét kell választani. Az eredmények fejezetben szigorúan csak az elért eredményeket szabad ismertetni. Lehetőleg csak a

saját munka eredményeit. Az eredmények és a megbeszélés összevonása rendkívül megnehezíti annak a megítélését, hogy mi a szerző saját munkája és mi másoké, akiket idéz. Még nehezebb elválasztani azt a szellemi tartalmat, ahogy ő értékeli a saját vagy a munkacsoport eredményeit, vagy mások hogyan értékelik a hasonló vagy ugyanolyan eredményeket. Ráadásul a megbeszélésbe bevonódnak a munkacsoporttól is különálló kutatók, akikre csak hivatkozik a szerző, de az ő eredményeik is bekerülnek az ún. saját eredmények közé. Ez az összevonás olvasmányosabbá, review szerűvé teszi a dolgozatot, de ebbe a fejezetbe (Eredmények és megbeszélés) módszerek is bekerültek, nem egyszer a résztémáknak külön bevezetése is van. Ezt követően van még egy Megbeszélés és Összegzés című fejezet, ebben viszont a disszertációból kimaradt közlemények rövid tartalmát is belefoglalja. Vagyis olyat, ami az eredményekben nem is szerepel. Így a disszertáció szerkezete nem segíti azt a tisztánlátást, melyet a bírálónak közvetíteni kellene az értékelő bizottság számára. Dícséretes viszont az új eredmények pontos felsorolása. Ebből 35-öt fogadok el új megállapításnak.

A disszertáció stílusa is inkább anekdótázó jellegű, mint szigorúan tudományos. Egy tudományos munkának az adatokról és az abból levont következtetéséről kell szólni. Csak arról. Nem érdekes annak a leírása, hogy egy másik munkacsoport hogyan és milyen rövid idővel hamarabb közölt ugyanolyan vagy hasonló eredményeket, és hogy milyen "emlékezetes és örömteli munka" valakit hozzásegíteni az első tudományos közleményeinek a megjelenéséhez. Ez inkább egy pszichológiai témájú disszertációba illik, ha tudományosan vizsgálják.

A szerző időnként megadja pontosan egy-egy résztémában, hogy annak kidolgozásában mi volt a szerepe. A disszertáció egészét tekintve viszont a fenti okok miatt ez összességében elmosódik. A saját munka, értelemszerűen főként a neuropathológiai jellegű megközelítés. Kevés kivételtől eltekintve az eredmények leírása vázlatos. Nagyon gyakran a résztéma bevezetése és a módszerek - az eredmények fejezetben - messze meghaladják a néhány mondatban összefoglalt tényleges eredményt. *(pl. a depresszió és a szinaptikus cink ion szabályozása Alzheimer kórban is ilyen résztéma. Vagy pl. a "Serotonin receptor kötődés változása vaszkuláris és kevert demenciában" című résztémában az eredmények között a módszerek vannak leírva, eredményként mindössze annyi, hogy "a különböző vaszkuláris demencia típusok közötti különbségre hívják fel a figyelmet neurokémiai szinten és a szerotonin receptor fontosságát igazolják a kognitív funkciókban". Igaz, hozzá van téve, hogy a részletes eredmények a Brain folyóiratban jelentek meg 2009-ben, de nincs megadva a közlemény száma a közlemények jegyzékében. Az MTA kívánalma az, hogy olyan doktori művet kell beadni, mely önmagában véve is alkalmas a kérelmező eredeti tudományos teljesítményének értékelésére.)* Üdítő kivétel a FUS és a TDP-43 proteinopathiák, valamint az optineurin szerepének bemutatása a neurodegeneratív kórképekben. A szövettani képek nem egyszer túlságosan kicsik ahhoz, hogy jól ábrázolják az eltéréseket, az új eredményeket. A 7. ábra (a harántcsikolt izom neurogén atrophiaja) pedig fölösleges, mert nem új eredmény, hanem inkább ismert tananyag a orvosoknak.

A dolgozatban sok gépelési hiba van, különösen a vége felé. Pl. a Megbeszélés és az összegzés utolsó 2/3-os oldalán 5-öt számoltam össze. Máshol vannak azonban olyan hibák is, melyek a mondat megértését is nehezítik. Mivel a disszertációt mind tartalmi, mind formai szempontból szükséges értékelni, a fenti formai visszasságokat említenem kell. Jelentős különbség van a szerző általam kiválóan ítélt munkássága és a megírt disszertáció minősége között.

A BEVEZETÉS olvasmányos. Jó összefoglalója a neurodegeneratív betegségek általános jellemzőinek és osztályozásának. *A neuropathológiai osztályozás alapján az elváltozások neuroanatomiai eloszlását, a szelektívnek gondolt károsodást tekinti. Mivel azonban a szelektív károsodás bizonyos betegségekben csak a kórfolyamat kezdetére jellemző, inkább a betegségekben előforduló kóros fehérjék jelenlétét preferálja a felosztás szempontjaként. Ez alapján 7 csoportot képez. Egyúttal feltételezi azt is, hogy a kóros szerkezetű fehérjék a neurodegeneratív betegségek legvalószínűbb okai. A fehérjék meghatározásával, az általuk is képzett intracelluláris zárványok kimutatásával a neuropathológia segít a klinikailag bizonytalan esetek diagnosztikájában, de módszereivel a sejt pusztulás pathomechanizmusáról is kapunk adatokat. Ezután a demencia történetileg változó kritériumait, gazdasági kihatásait, főbb klinikai típusait és okait tekinti át főként neuropathológiai szempontból, de a diagnosztikához szükséges genetikai, klinikai és képalkotó diagnosztikai, neurokémiai és neurophysiológiai aspektusait is összefoglalja.* Ezzel **a kiválóan megírt bevezetéssel demonstrálja, hogy mind a történetében, mind a biológiájában, mind a pathológiájában a neurodegeneráció kiváló szakértője.** Ezután tér rá a neuropathológiai vizsgálat standardizált algoritmusára, majd a kutatáshoz használt MÓDSZEREK leltárszerű felsorolását adja meg. A módszerek korszerűek, túllépnek a rutin neuropathológián. *Immunohisztokémiai, Western blot, genetikai, sejtbiológiai, főleg transzgenikus állatkísérletes vizsgálatok, statisztikai értékelés segítik a neurodegeneratív betegségek diagnosztikáját, etiológiájának és pathomechanizmusának a megismerését.*

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS főcímmel kezdődik az új eredmények részletesebb leírása. Ez a multidiszciplináris megközelítés történik a FUS gén mutációi és a familiális ALS összefüggésének bemutatásával is. A FUS gén mutációkat a TDP-43 fehérjét kódoló gén mutációjának a leírása után 6 kandidáns génre szűkített csoportban találták. Ez a mutáció a familiális esetek 3%-ában igazolódott. Nemzetközi együttműködésben 20 FUS mutáns egyedet azonosítottak, melyekből 3-nak történt meg a részletes neuropathológiai vizsgálata. Nincs kétségem, hogy ez utóbbi a jelölt munkája. Viszont meg kell kérdeznem ki irányította a nemzetközi együttműködést, ki állította össze a klinikai adatokat (korai kezdet, demencia hiánya), ki végezte a genetikai vizsgálatokat. A pathológiai vizsgálatok meggyőzőek, melyek néhány részletét szövettani képeken be is mutatja a szerző. **Az 5. ábrán lévő makroszkópos képeken azonban a gyököket "mozgató és szenzoros idegeknek" nevezi, ami anatómiai értelemben nem helytálló. Mi magyarázza a gerincvelői hátsó fehérállományi pályarendszerekben a mérsékelt demyelinizációt? Volt-e élőben kimutatott szenzoros deficit (mélyérzés zavar)?** A szerző által klasszikus ALS-nek nevezett esetekre jellegzetes, immunohisztokémiával Ubikvitin és p62 pozitív "szálcsás" (skein like) inclusiókat megtalálta a

mellsőszarvi motoneuronokban. FUS antitesttel globosus és elnyúlt zárványokat tudott kimutatni a gerincvelői mellső szarvi motoneuronokban, de diffúz cytoplasmikus jelölődést is bemutat a 4. ábrán. Hasonló jelenségeket SOD-1 mutáns vagy sporadikus ALS-ben ill. nem neurológiai kontroll esetekben nem talált. Mennyi volt a kontroll esetek száma? Van-e átfedés a szálcás és a FUS immunopozitív zárványok között? A szerző szerint van-e jelentősége a motoneuron pusztulás pathomechanizmusában a különféle, nem FUS immunopozitív zárványoknak? Patkányból származó neuronális sejtenyészetekben a normál FUS génnel transzfektált sejtekben a FUS immunohisztokémia nucleáris, a mutáns génnel történő transzfekció cytoplazmás lokalizációt adott. Ennek az igazolását fluorescens vizsgálattal értem. Immunoblot vizsgálattal hogyan történt a nucleáris és a cytoplazmatikus lokalizáció? A sejtenyészetek motoneuronok voltak-e? Az eredmények alapján a munkacsoport elindította a FUS proteinopathiák vizsgálatát a neurodegeneratív betegségekben. Később genetikai és nem részletezett sejtbiológiai módszerekkel megállapították, hogy ha a mutáció a fehérje nucleáris lokalizációs szignál terminális régiójában van, akkor a FUS a cytoplasmában halmozódik fel. A kóros elhelyezkedést a nucleáris transzport zavara okozza. A mutáns SOD cytoplazmatikus lokalizációja az első kóros jelenség, melyet követ a celluláris, oxidatív stressz kiváltotta aggregáció majd sequestráció.

A kóros folyamatok az RNS processzálást zavarják meg. A 8-as ábrán kis nagyításban ugyan, de láthatók glia sejtekben is a FUS zárványok. Milyen glia sejtekről van szó? Gondolom astrocytákról. Ha azokban ugyanúgy működik a fenti mechanizmus, miért nincs sejt pusztulás, sőt aktiválódás következik be. Nincs említés arról, hogy van-e FUS zárvány a felső (corticális) motoneuronokban. Ha nincs, akkor hogyan magyarázható a fenti hipotézissel a pusztulásuk? A citációkat számolva ez a legjelentősebb része a vizsgálatoknak. Csak éppen a disszertáció címébe nem illik bele, mert ebben a betegségben a szerző szerint sincs kognitív zavar.

Az FTLD-FUS esetekben a Transportin-1 (nucleo-cytoplazmatikus transport fehérje) colokalizál a FUS-szal a zárványokban, az ALS-FUS esetekben viszont nem. Ebből arra következtetnek, hogy más a két állapot pathomechanizmusa. Kérdésem az, hogy a kettő együtt, egy betegben nem fordul elő? Ha igen, akkor is feltételezik az eltérő pathomechanizmust? A normál human FUS gént overexpresszáló transzgenikus egerekben is kialakulnak a motoneuron betegség jelei és a FUS pozitív cytoplazmatikus zárványok. Miért nem hoztak létre és vizsgáltak a mutáns human FUS-szal létrehozott transzgenikus egereket? Ráadásul az FTLD-FUS sporadikus is lehet, s nem a gén mutációja okozza. Nekem így nem világos, hogy a mutáns FUS fehérjének, az ebből kialakuló zárványoknak, vagy a normál fehérjéből létrejött zárványoknak mi lehet a szerepe a pathomechanizmusban. Hogyan értelmezi a jelölt mindezeket? Az astro és microglia cytoplasma is fokozott mennyiségben tartalmazza a FUS fehérjét, Ezeket a sejteket mi védi meg a károsodástól? Nem lehetséges az, hogy magának a zárványnak nincs is szerepe, vagy az ellenkezője, hogy akármilyen fehérjéből álló zárvány betegséget okoz? A mutáns

FUS fehérje okoz-e működészavart a szervezet nem idegrendszeri sejtjeiben? Ha nem, mi magyarázza a károsodás specificitását?

A TDP-43 proteinopathiák is mind az ALS-ben, mind a FTD-ban előfordulnak. *Ennek a fehérjének a miszlokalizációját is kimutatták. Mind a mutans, mind a vad típusú protein a cytoplasmában halmozódik. Ebből arra következtettek, hogy a fehérje transportjéért felelős proteint kell megtalálniuk. Humán neuroblastoma sejtekben siRNS konstruktumokkal vizsgálták a transzport fehérjék blokkolását. A Karyopherin-Béta1 szelektív kötődését tudták kimutatni a TDP-43-hoz. Ebből feltételezik, hogy ennek a fehérjének szerepe lehet a TDP-43 cytoplasma-nucleus irányú transportjában.*

Összegezve a proteinopathiákkal kapcsolatos vizsgálatokat, számos részadatra rávilágítottak, de a rendelkezésükre álló igen korszerű módszerekkel sem sikerült megérteni ezeknek a fehérjéknek a szerepét a neurodegeneráció pathomechanizmusában.

Az Alzheimer kóros esetek 20-30 %-ban is van TDP-43 pathológia, elsősorban a hippocampusban. Feltételezték, hogy ezekben az esetekben a tau protein hasítási zavara (mis-splicing) járulékos pathogenetikai tényező, de ezt igazolni nem tudták. **Így a hypothesisük nem igazolódott, de közlemény azért lett belőle. Itt tulajdonképpen a saját hypothesis nem igazolható voltát közölték, igazolták annak helytelenségét. Ez inkább akkor fogadható el tudományos teljesítménynek, ha más hypothesisét cáfolják.**

Miután egy familiáris ALS-ben szenvedő japán családnál leírták 2010-ben az **optineurin** mutációjának esetleges szerepét, a jelölt munkacsoportja hatalmas munkával igyekezett kideríteni az optineurin szerepét más központi idegrendszeri betegségekben is, beleértve az Alzheimer, Huntington betegségeket, PSP-t, spinocerebelláris degenerációkat. Ennek a munkának a bemutatása 7 oldalt tesz ki az értekezésben. *A szerzők sporadikus ALS-ben, SOD-1 mutációkban találtak a motoneuronokban intracytoplasmikus inclusionsokat vagy diffúz immunopozitivitást. A kontrollokban hasonló jelenségek nem voltak. Ismételten az eredmények fejezetben a szerző teljesen leírva belekeveri a módszereket, melyek az eredmények megbízhatóságát igyekszik igazolni. A közölt szövettani képek is jórészt informatívak. Végül az optineurin immunopozitív agyi és gerincvelői jelenléte nem mutatott korrelációt a klinikai fenotípus, a betegség tartam, a demográfiai jellemzők vonatkozásában. A Western blot vizsgálatok csökkent szintet mutattak (kevesebb a neuron). Végül nem igazolódott a japán szerzők feltételezése, miszerint az Optineurin, az azt tartalmazó zárványok központi szerepet játszanak az ALS pathogenesisében. Egyéb neurodegeneratív betegségek vonatkozásában sem igazolódott ez. Más munkacsoportok későbbi vizsgálatai ugyanezre a következtetésre jutottak.*

Ezt követően a szerző visszatér a TDP-43 proteinopathiák RNS kötőhelyeinek és az RNS hasítás (splicing) szabályozásában játszott szerepének a vizsgálatára. Az 55. oldal utolsó előtti sorában "a TDP-43 elleneshez való kötődési hely"-et ír, ami nyilvánvalóan RNS. Ehhez egy akkor forradalminak nevezett új módszert használtak a genetikusok (individual-nucleotide resolution clip). A szerző érdeme, hogy ezt post

mortem human agyszöveten tudták elvégezni, hiszen ő választotta ki a megfelelő agyrészleteket. Az általa kiválasztott mintákban nagyszámú, általa "TDP-43-ellenes"-nek nevezett kötőhelyet sikerült azonosítani (TDP-43 RNS!?). Ennek a jelentőségére nem kapunk magyarázatot. Mi a normál agyszövetben talált kötőhelyek jelentősége, mi az összefüggés a kóros TDP-43 betegség okozásával?

Neuroblastoma sejtvonalon igazolt nagyszámú splicing eltérés is csak lehetséges magyarázatait adja olyan fehérjék alternatív mRNS splicing-jának, melyeknek jelentősége lehet az apoptózisban, a sejtek túlélésében, trophicus factorokra történő reagálásában. Ismert, hogy a TDP-43 hiánya embryonális lethaliást okoz, többlete toxicus a sejtekben (Tsao W. et al, Brain Res. 1462, 26-39. 2012, Wachter N et al. Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener. 16, 431-441. 2015, Igaz L. et al. J. Clin. Invest. 121, 726-738. 2011.). Mivel a TDP-43 az összes DNS-ről RNS-re átírt gén 1/3-ához kötődik, nagyon sok lehetősége van a sejtek károsodásának. Mennyire érzi a jelölt ezt a kutatási vonalat ígéretesnek a neurodegeneratív betegségek, az ALS, a demenciák vonatkozásában?

A módszereket sikeresen használta fel a munkacsoport az idősödő agyban és a demenciákban eltérő RNS hasítás kimutatására. Az öregedésben talált gén expresszió változások elsősorban metabolikus folyamatokat érintenek, a betegség specifikus eltérések viszont a neuronális és oligodendroglia működések változását okozzák.

A TDP-43 szerepét demonstrálja az az általuk vizsgált transzgenikus egérmodel, melyben a vad típusú és a mutáns TDP-43 ko-expressziója a humán ALS-hez hasonló betegséget okoz. Mi lehet ennek a magyarázata? Hasonló jelenség figyelhető meg az SOD-1 mutációs transzgenikus egerekben is.

A munkacsoport leírta, hogy a TDP-43 a proteinopathiákban zárvány alkotó fehérje, mely ubikvitinnel, p62-vel colocalizált, s egy Guam szigeti esetben hyperfoszforilált tau-val is és egy esetben SOD-1 mutáns fehérjével együtt volt detektálható. Ez utóbbi az irodalmi adatok szerint igen ritka. Lehet-e tudni, milyen relációban vannak ezek a zárványok az ún. Bunina testekkel (1962), ill. a később leírt hyalin-szerű zárványokkal?

A vesicle-associated membrane protein – associated protein mutáns transzgenikus egerekben enyhe motoneuron betegség fejlődik ki és TDP-43 protein zárványok jelennek meg, melyek tartalmazzák a kóros proteint, ubikvitiniláltak, és szerző szerint p63-hoz kötődnek. (Ez utóbbin valószínűleg a p62-t érti). Arra következtet ebből, hogy az ALS 8 modellbetegsége is TDP-43 proteinopathia. Az irodalomban azonban a fehérje funkció vesztese és új funkció nyérése egyaránt szerepel a károsodás magyarázataként. A humán ALS 8-ban van-e TDP-43 zárvány? Van-e neurocognitív zavar, mint ahogy a címben szerepel?

A következő fejezetben a TDP-43 negatív, de P62 és ubikvitin pozitív zárványokkal járó FTD-ALS eseteket vizsgálták szisztematikusan. A zárványok megjelentek a cerebellumban és a hippocampusban is. 36 betegből 14-ben megtalálták a C9orf72 mutációját (hexanucleotid ismétlődés expansióját). A p62 pozitív zárványok globuláris ill. csillag alakúak és a többségükben nincs a TDP-43 hyperfoszforilált formájával reagáló antitesttel immunohisztokémiai reakció. A hippocampusban és a

cerebellumban intranucleáris inclusiók is vannak. **Ezt az immunohisztokémiai mintázatot pathognomikusnak tartja a C9orf72 mutációs ALS és a FTL-D-TDP-43 esetekre és a TDP-43 proteinopathiák új csoportjaként írja le. Az olvasó számára ezzel az egész leírást érthetlenné teszi (előzőleg azt írja, TDP-43 negatív eseteket vizsgáltak, ráadásul ugyanazon az oldalon (66.) az NCI rövidítést egyszer nucleáris cytoplazmatikus inclusiónak, máskor neuronális cytoplazmatikus inclusiónak értelmezi). A zárványok cerebelláris lokalizációja jár-e kimutatható cerebelláris tünetekkel?**

Négy ALS fenotipusú és a szerző által extramotor pathológiával jellemzett esetet is leírtak. Cognitív deficit nem volt. A C9orf72 mutáció a gén későbbi felfedezése során igazolódott ezekben az esetekben. Utal a szerző a részletes neuropathológiai jellemzésre, a nagyszámú immunohisztokémiai reakcióra, melyet alkalmaztak, **külön kiemeli a postmortális anyagban elsőként végzett elektronmikroszkópos vizsgálatot. Ennek szerzőtársát is megadja, az eredményét azonban nem is említi.**

Multicentrikus európai vizsgálattal megállapították, hogy a C9orf72 Európában a leggyakoribb genetikai eltérés familiális és sporadikus ALS-ben, és ezt egy 6500 évvel ezelőtt egy egyedben bekövetkező mutációra lehet visszavezetni. A vizsgálatokba a disszertáció szerzőjének a pathológiai anyagait is bevonták.

A motoneuron és kisebb részben a gliális zárványok fehérjeösszetételét vizsgálva mind a familiális mind a sporadikus ALS-ben gamma-szinukleint mutattak ki immunohisztokémiai és Western blot vizsgálatokkal a dorsolaterális gerincvelői fehérállományban az axonokban a 44 vizsgált ALS elhunytban. Ennek a jelentősége még nem ismert.

Az irodalom retrospektív vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottak, hogy nem igazolható, hogy az áramütés kóros szerepet játszik az ALS kialakulásában. A kérdésem az, hogy milyen indíttatásból került ez munka a disszertációba, amelynek címe a neuropathológiai vizsgálatok neurocognitív zavarral járó betegségekben? Sem neuropathológiai vizsgálat nem történt, sem cognitív zavarral járó betegség nem állt fenn.

A következő nagy fejezet az Alzheimer kór vizsgálatáról szól.

Kimutatták, hogy a Presenilin funkcióvesztéses mutációja a Ciklin-D1 felszaporodást, és következményes abortív sejtciklus aktivációt okoz apoptosissal a neuronokban a humán mutációt expresszáló transzgenikus egerekben és a humán betegségben is.

*Kimutatták, hogy egerekben a térbeli tájékozódás tanulása során (Morris water maze vizsgálatok) a hippocampusban emelkedik a cyclin dependens kinase-5 aktivátor p35 és p25 szintje (tükrözve az emlékező funkciók javulását) és emelkedik a szeptin 7 és OPA1 szintje (melyek a dendritikus tüskék és a sejtek közötti kapcsolatok kialakulásában fontosak). **Elektron mikroszkópos vizsgálatokkal igazolták a presynaptikus vezikulák és a dendritikus tüskék számának "kedvező" változását***

(gondolom, hogy a növekedését). A p35 és p25 szintje az Alzheimer kórosok agyában csökken a postmortális vizsgálatok szerint. Hasonló eltéréseket találtak schizophréniás betegek agymintáiban is.

A presynaptikus vesiculáris protein CSP-alpha szintjét is csökkentnek találták Alzheimer kórosok postmortálisan vizsgált előagyi régióiban, míg a cerebellumban emelkedett. Ennek alapján feltételezik ennek a proteinek a neuroprotektív hatását, mert Alzheimer kórosok a cerebellum nem károsodik. Humán tau-proteint expresszáló transzgenikus egerekben is azt tapasztalták, hogy ha a CSP-alpha expressio fokozott, a neuronvesztés nem számottevő. Miért van egyáltalán neuronvesztés a normál humán tau-proteint expresszáló egérben?

Olyan transzgenikus egérben mely a humán tau 35 kDalton méretű fragmentjét overexpresszálta, a humán taupathia neuropathológiai, kognitív, viselkedési és sejtbiológiai jellemzői alakultak ki. Melyik humán taupathiához, melyik humán betegséghez hasonló? Miért éppen ezt a fragmenst választották a transzgenikus átvitelhez? A betegellátásban engedélyezett vegyület "fenilbutatrat" visszafordította az eltéréseket. Valóban ez a név? Natrium és glicerín fenilbutirátot találtam csak emberi használatra.

A klasterin specifikusan kötődik az amyloid beta fehérje 40 aminosav hosszúságú altípusához és nem kötődik a 42 aminosavból álló formájához. Az Alzheimer kórosok plakkaiban a 40 aminosav hosszúságú amyloidhoz kötődik a klasterin, ugyanúgy mint az angiopathiás erekben. Tau-hoz kötődő klasterint nem láttak. Az irodalomban eltérő eredményeket a postmortális szövetek az éltől vagy az ex vivo nyerttől eltérő károsodási fokával, az antigént előhívó technikák és az antitestek különbözőségével magyarázza.

Ezeknek a vizsgálatoknak a jelentősége az, hogy további adatokat szolgáltatnak az Alzheimer kórosok előforduló neuron degenerációról, az emlékezéssel, tanulással kapcsolatos fehérjék mennyiségi változásairól. Ezek az adatok részben kapcsolhatók az amyloid, részben a tau hypothézishez, de a teljes kép még nem áll össze. További jelentősége az, hogy ráirányítja a figyelmet arra, hogy a postmortális szövetből is nyerhető adatok az élő szervezetben zajló folyamatokról. A vizsgált anyagoknál mennyi idő telt el a halál és a vizsgált szövet eltávolítása között?

Nagyon értékesnek látom a **Lewy testes és a Parkinson kórhoz társuló demenciák klinikopathológiai jellegű feldolgozását.** Ebben a kognitív deficit mértékét korreláltatták statisztikailag is megerősítve a szövettani eltérések mértékével. Négy releváns agyi régiót hasonlítottak össze, amelyek szerint megoszlának a vizsgált proteinopathiák. A súlyosság mértékének a definícióit pontosan megadja. A kognitív funkciók mérésére a Mini-Mental State Examination-t használták. Az eredmények az alábbiak: i.) az alpha synuclein pathológia súlyossága összefüggést mutat a kognitív képességek csökkenésével, ii.) Mindkét Lewy testes demenciában az Alzheimer típusú amyloid és tau pathológia egyidejű fennállása nagyobb kognitív deficitet és gyorsabb romlást eredményez, iii.) Az MMSE teszt pontszám csökkenés gyorsabb üteme jobb jelzője a neuropathológia súlyosságának, mint a halál előtt végzett utolsó vizsgálat pontértéke. iv.), v.) az amyloid szorososan, a tau immunoassay eredményei kevésbé egyértelműen korreláltak az amyloid beta szöveti koncentrációjával ill. az ún. plak score-okkal. (Ez éppen várható volt, hiszen ugyanazt nézték két különböző módszerrel.) vi.) a proteinopathia-jellegű pathológia összegzett értéke pontosan korrelál a kognitív képességek csökkenésének a mértékével, vagyis a folyamatok szinergisztikusan károsítják az idegrendszert. vii.) ha a synucleinopathiás demenciákban kimutatható az Alzheimer típusú pathológia, indokolt annak is a kezelése viii.) **A legfontosabb megállapítás az, hogy a**

neurodegeneratív betegségek nagyon gyakran kevert proteinopathiák összességének a következményei.

Egy öt éves prospektív vizsgálatban megállapították, hogy a DLB-ben gyorsabb a kognitív hanyatlás, mint Alzheimer kórban. *Ezért sem lehet a demenciákat mint syndromát összevonni a gyógyszerkipróbálásoknál. A vizsgálatból bebizonyosodott ismét, hogy a leggondosabb klinikai vizsgálatok sem mindig adnak biztos diagnoszt. Alapvető fontosságú volt a jelölt által felállított autopsziás diagnosis.* **A Lewy testes és Alzheimer demenciában is korai tünetnek találták a depressziót.** Hypothesisként felvetik, hogy a kognitív hanyatlás gyógyszerei kedvezőek lehetnek a depresszív tünetekre. A klinikai gyakorlat azonban a fordítottját mutatja. A neuropathológiai anyagban a BA9 (dorsolaterális frontális régió) ZnT-3 szinaptikus fehérje szintjét mind Alzheimer, mind diffúz Lewy testes, mind Parkinson kórhoz társuló demenciában alacsonynak találták. A PSD-95 (postsynaptikus densitás protein) szintje ugyanúgy csökkent, correlálva a kognitív hanyatlással. Az utóbbi mennyisége a diffúz Lewy testes és Parkinson demenciában különbözött. A különbség iránya azonban nincs megadva. (Ehhez hasonló, nem konkrét megfogalmazások többször is előfordulnak a disszertációban, holott ez az "Eredmények" fejezet része. A ZnT-3 és a PSD-95 szintjét a synucleinopathiákban csökkentnek találták, az Alzheimer kórban és a kontrollokban nem. Ez az előző aláhúzotthoz viszonyítva ellenkező megállapítás. Melyik volt az igaz? A további szinaptikus fehérjék vizsgálata eredményeinek, pl. a Dinamin-1 szintjének a leírása számomra érthetelen ("különböző demencia típusokban nem mutatott különbséget és nem eltérő a kontroll csoport részletétől sem, azonban ha a szintjét a kognitív hanyatlás mértékével azonosítjuk, akkor pozitív korreláció adódik"). A kalmodulin-dependens protein kináz II alpha (CMK II) szintje szignifikáns különbséget mutatott valamennyi demencia típusban a kontroll csoporthoz képest. Csökkenést, vagy emelkedést? A beteg kontrollokhoz képest, vagy a normál kontrollokhoz képest? Ezek után további szinaptikus fehérjék (Dinamin-1 /ez már előzőleg szerepelt/, WAMP2, Rab3A, SNAP25 és neurogranin9 összefüggését igazolták a kognitív hanyatlás mértékével. Adatok azonban nincsenek bemutatva, amelyek meggyőznék az olvasót. Így ennek a fejezetnek a leírás alapján nem tudom minősíteni a tartalmát, csak a leírást, ami ellentmondásos. Kérdésem, hogy a nem neurodegeneratív betegségben szenvedők depressziója mutatja-e azokat az eltéréseket, melyeket a degeneratív betegségekben leírtak? Ez lenne egy olyan vizsgálat, ami tisztázná, hogy a depresszióknak van-e neuropathológiai szubsztrátuma. Pl. suicid személyeken lehetne vizsgálni. Ugyancsak különbözik az unfolded protein response az alpha-synucleinopathiákban az Alzheimer kórosokhoz és a normál kontroll csoporthoz képest, de csak a gyrus cinguliban és a parietalis kéregben. A prefrontális és a temporális cortexben nem. Lehet-e ezen területi limitációban mért glucose-regulált protein szint emelkedésből (az unfolded protein response szabályozója), és ennek az egy proteinnek az

emelkedéséből levonni azt a következtetést "hogyan ez a sejtválasz" fontos szerepet játszik A Lewy testes és Parkinson betegséggel kapcsolatos demenciákban?

A neuropathológia konszensusokat örömmel olvastam - a béta amyloid lerakódásról a neurodegeneratív kórképekben és az idősödő agyban, - a frontotemporális lobáris degeneratio TDP-43-pozitív inclusionsokkal kapcsolatban, - a frontális temporális lobáris degeneráció-tau Pick testekkel a hippocampusban jelenséggel kapcsolatban, - az időskori tau astrogliopathiával kapcsolatban. A konszensusok jellegéből következik, hogy több kutató, alkalmanként 60-nál is több konszensusa, nem tekinthető önálló eredménynek. Akkor sem, ha megtisztelő ilyen konszenzust kialakító szakmai tudományos közösségekben tagnak lenni.

A következő fejezetben leírja, hogy a vezikuláris glutamát transzporter-1 protein szintjét nem demens stroke-os elhunytakban (és nem betegekben!) emelkedettebbnek találták, mint a vasculáris demencia, kevert demencia, Alzheimer demencia esetében. Nem inkább arról van szó, hogy az utóbbiak esetében csökkent?

A 111. oldalon hivatkozik "korai tanulmányokra (Gottfries és munkatársai 1994)", melyek a "vasculáris demenciában jelentős kognitív deficitet írtak le". Ez annyira magától értetődő, - hiszen a demencia kognitív deficit, - hogy megnéztem mi is ez. (Az idézett forrás azonban a vasculáris demenciában talált neurokémiai eltéréseket írta le.) Ez után a fals gondolatmenet azzal folytatódik, hogy "egy évtizeddel később egy részletesebb tanulmány csak a vasculáris demencia Alzheimer-kórral szövődött eseteiben írta ezt le". Ezzel a hibás idézéssel állítja szembe a saját munkájukat, mely "neurokémiai, neuropathológiai vonatkozásokat egyaránt tartalmaz". **A cholin acetyl transferase aktivitásának a csökkenését igazolták a vasculáris demencia és Alzheimer kór együttes előfordulásában. Post-stroke demencia esetén aktivitás emelkedést észleltek a frontális lebenyben. Nincs adat a disszertációban a tisztán vasculáris demencia vagy a tisztán Alzheimer betegségben előforduló változásokról. **Leírták a serotonin receptor kötődés változásait is radioligánd kötődéseinek a mérésével. A jelölt az eredmények akár egymondatos konkrét leírása helyett hivatkozik a közleményükre és felhívja a figyelmet a különböző vasculáris demencia típusok közötti különbségekre.** Az általa kiválasztott szövetmintákban ELISA módszerrel különböző gyulladásos mediátorok szintjét határozták meg. A monocyta chemoattractant protein-1 (MCP-1) szintjét drasztikusan csökkentnek találták vasculáris és kevert demenciában. Az IL-6 is csökkenést mutatott. **A conclusio az, hogy vasculáris és kevert demenciákban a gyulladásos reakció mérsékeltebb, mint Alzheimer kórban. Az Alzheimer kórban talált eredmények azokban nincsenek megadva.****

A következő három oldal arról számol be, hogy az amyloid prekursor protein mint az acut axonális károsodás szövettani markere az agyból készült metszeteken immunohisztokémiai módszerekkel legkorábban a traumát követően 35 perc túlélés után mutatható ki. Ezekben az esetekben nincs szó

sem neurocognitív zavarról, sem betegségről. Miért került ez a munka be a neurocognitív zavarral járó betegségek közé?

A poly(ADP-ribóze) polymerase gátlásának neuroprotektív szerepét a Klatzo által 1958-ban leírt hideg léziós kísérlettel igazolták. A PARP gátlása csökkentette a lézió nagyságát. A chronicus neurocognitív zavarral járó betegségekben nem vizsgálták a PARP szerepét.

A MEGBESZÉLÉS ÉS ÖSSZEGZÉS fejezet sok általánosságot tartalmaz, mivel az eredmények részfejezetben már értékelte legtöbbször a szerző az eredményeket. Sőt gyakran csak értékelés van, de az eredmények nincsenek bemutatva. Mivel munkák sem a címhez, sokszor egymáshoz sincsenek illesztve, nincs egy logikus vezérfonal melyre felfűzhető a disszertáció gondolati tartalma, nehéz hozzá összegzést írni. A szerző megismétli a neuronális sejtcyclus zavarának a jelentőségét Alzheimer kórban, a microglia sejtek kiemelt funkciójáról értekezik (bár erre minimális vizsgálat utal csak), a synaptikus dysfunctió szerepét újra hangsúlyozza, discutálja az endocannabinoid rendszer szerepét az Alzheimer kórban (bár erről eddig nem esett szó), és hivatkozik más, a disszertációban nem szereplő közleményeire, próbálja bemutatni őket ebben a részben.

A magam összegzése a disszertációról.

A disszertáció olyan, mint egy nagy mozaik, melynek számos darabja hiányzik, a meglévő darabokat pedig mintha más és más rendelte volna. A disszertáció feladata az, hogy segítse a jelölt munkájának értékelését. Erről a disszertációról ez nem mondható el. Az egész munkát úgy kellene bemutatni, hogy önmagában egy tudományos közlemény legyen. Tartsa azokat a standardokat, amelyeket megkívánunk egy tudományos közléstől. Nincs benne helye anekdótális írásmódnak, az objektív adatokhoz fűzött érzelmi megnyilvánulásoknak. Legfőképpen nem lehetnek benne tartalmi hibák, melyekre utaltam, hibás mondatok, melyek a megértést nehezítik. És nem lehet ilyen nagy számú gépelési hiba. Az akadémiai doktori disszertációt általában egyszer védünk, különleges, felemelő alkalom. Azzal is meg kell tisztelnünk, hogy igyekszünk a tudományos közlés tradíciói szerint megírni, lehetőleg hibátlanul. A munka tartósan megmarad, bármikor elővehető, bárki által megnézhető, s a bíráló nem compromittálhatja magát azzal, hogy a hibákra nem hívja fel a figyelmet.

A doktori mű alapjául szolgáló munka tudományos eredményei jelentősek, újak, hiteles adatokat tartalmaznak. Új tudományos eredménynek fogadom el a KÖVETKEZTETÉSEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK 1-29, valamint a 35-40. pontjait. Elfogadom új eredménynek a neurológiai konszenzus kritériumokat is (30-34.), de ezeket nem tekinthetem a jelölt kizárólagos munkájának. A munkát nyilvános vitára alkalmasnak tartom.

Szeged, 2017. március 6.

Dr. Engelhardt József

egyetemi tanár

MTA Doktora

SZTE Neurológiai Klinika