

Opponensi vélemény

Alpár Alán:

„Funkcionális anatómiai változások Alzheimer-kórban”

című doktori disszertációjáról.

Alpár Alán doktori disszertációja monográfia formában íródott, 207 oldal terjedelmű munka. Túlnyomóan morfológiai adatokkal gazdagon illusztrált műről van szó, mely nagyjából (a közlemény jegyzék alapján legalábbis) 12-13 esztendő tudományos kutatómunkájának összefoglalása. A munkásság bizonyos darabjai külföldi kutatóhelyeken keletkeztek. Ezekben értelemszerűen külföldi kollégák munkája is reprezentálódik. Bizonyos munkákat (szerzőtársakkal) a budapesti anatómiai intézetben állított elő. A munkásság darabjai meglehetősen szerteágazóak; amint említettem nagyrészt morfológiai természetűek – de vannak molekuláris biológiai és viselkedéstani kísérletek is. A szerteágazó kísérleti megközelítéseket a neurodegeneráció tematikája köré csoportosítja. Állatkísérleteit humán autopsziás anyagok vizsgálatával próbálja támogatni. A disszertáció rövidebb filogenetikai „kirándulásokat” is tartalmaz, melyek során nem szokványos emlősfajokat és madáragyakat is vizsgál. A disszertáció végén „supplementum” található, amely tartalmazza mindazokat a táblázatokat, melyek részben az módszertani fejezet, részben az eredményeket taglaló fejezet részei – ám oda történő beillesztésük az adatok sokasága miatt megnehezítette volna az olvasó dolgát. Összesen 18 táblázat tartozik az értekezéshez. A disszertáció 442 referenciát használ; ezeket áttekinthetően ABC sorrendben sorolja fel. A disszertáció fejezeteit sorra vesszük bírálatunkban.

A „Bevezetés” bírálata

Előljáróban tömör leírást kapunk az Alzheimer-kórrol a citoszkeleton patológia felé irányítva az olvasó figyelmét; a patomechanizmus sok szempontból homályos, ezért érdemes transzgenikus állatokat használni. Utalás történik az agyi extracelluláris mátrix szerepére is. Alfejezet foglalkozik az amiloid prekursor fehérje szerkezetével: szerző röviden összefoglalja az amiloid prekursor fehérje normális és patológiás jelentőségét. Rövid fejezet foglalkozik a tau fehérje foszforilációjának fontosságával, majd a Ras G-fehérje és a MAPK fehérjecsalád következik. Mindezek bevezetik a neuron-alak és neuron-méret változásaival kapcsolatos vizsgálatok ismertetését. Következő alfejezetben az endokannabinoid rendszer szerepét foglalja össze: itt utalás történik az endokannabinoidok lehetséges szerepére a központi idegrendszeri

gyulladásokban. Végül kissé hosszabb bevezető szöveg foglalkozik az agyi extracelluláris matrix kémiai összetételével, és a matrix lehetséges patológiai jelentőségével neurodegenerációban. Miután a szöveg nem könyvfejezet, hanem egy szerteágazó problematikájú disszertáció része, megfelel a célnak, és bevezeti az olvasót a mű problémakörébe.

A „Célkitűzések”

A disszertáció célkitűzései a bevezetés alfejezeteinek megfelelő problémafelvetések. Emellett célkitűzésként szerepel differenciálatlan neuronpopulációk (neuroblastok) keresése az emlős agyban – egyfajta plaszticitási „megoldásként” a neurodegeneráció ellensúlyozására. Mindaddig a tartalom jól követhető és a szerkesztés következetes.

Az „Anyag és módszer” fejezet

Ebben a fejezetben viszonylag részletesen ismerteti a kutatási módszereket. Megtörténik a transzgenikus egértörzsek rövid jellemzése: előállításuk illetve felhasználásuk bizonyos molekuláris mechanizmusok modellezésére. A vizsgált transzgenikus egerek:

1. B6-Py8.9: humán amiloid prekursor proteint kódoló élesztőkromoszóma – az állatok nem mutatnak Alzheimer-tüneteket és neuropatológiát.
2. PDGF-hAPPwt: szintén humán amiloid prekursor proteint expresszál. Nincs amiloid lerakódás az állatban.
3. Tg2576: hAPP695 expressziót mutat. Az állatban amiloid plakkok képződnek.
4. A p21H-RasVal12 transzgén expresszáló állattörzs. Ennek segítségével a Ras valamint MAPK szerepét vizsgálta.

Valamely oknál fogva egy transzgén törzset szerző nem említ ebben a fejezetben (APdE9: a táblázatokban szerepel). Ismertetésre kerülnek a műtéti technikák, a pályakövetési módszerek, a neurogenesis vizsgálata és az *in vivo* sejtfeltöltés; a viselkedési tesztek és egyéb, az állatok fizikai aktivitásával és a hibernációval kapcsolatos módszerek. Ismerteti a vezikuláris GABA transzporter antitest *in vivo* felhasználási módszerét is. Ezt az antitestet gátló interneuron populációk elpusztítására használta a deafferentációs kísérletekben. A függelékben lévő táblázatokkal együtt és kiegészítve azt mondhatjuk, hogy a módszertani fejezet kimerítő és alapos. A bírálók követni tudják a kísérletek részleteit, és ellenőrizni lehet a felhasznált reagenseket is.

Az „Eredmények” fejezet

Ebben a fejezetben szerző leírja szerteágazó kísérleteinek eredményeit, melyeket fény- és elektron mikroszkópos mikrofotográfiákkal, grafikonokkal, camera lucida rajzokkal és Western-blot fényképekkel illusztrál. Minden ábrához ábramagyarázat tartozik. Az eredmények prezentációja áttekinthető és követhető. Minden lényeges állítását ábrával bizonyítja, ami megadja a disszertáció hitelességét. Sajnos, az ábrák minősége néhány fejezetben nagyon rossz – ezekben az olvasó csupán a szöveget és a grafikonokat tudja értelmezni. Az ábrák minőségéről az egyes fejezetek során teszünk említést.

A dendritfa morfológiai változásainak vizsgálata agykéregben, transzgenikus egerekben

A transzgenikus állatokban, melyekben béta-amiloid lerakódások vannak (Tg2576 egértörzs) mérsékelt dendrit degeneráció is kimutatható. A B6-Py8.9 egértörzsben, mely humán amiloid prekursor fehérjét expresszál, dendrit hipertrófia mérhető. Miután a dendritfa morfológiai változásai az afferentáció változásait is tükrözhetik, szerző megvizsgálta az axonterminálisok eloszlását a kérdéses transzgenikus állatokban. Nem talált igazán szignifikáns változást (a cholinerg végződések mérsékelt növekedést mutattak). Ezért megvizsgálta azt, hogy műtéti deafferentációval milyen dendritikus elváltozások következnek be. A dendrit degenerációt mutató egértörzsben elvégzett deafferentáció (vibrissa eltávolítás) súlyosbítja a dendrit degenerációt. A dendrit degenerációt mérsékelte, ha az állatok rendszeresen többet mozogtak (ketrecükbe mókuskereket helyeztek). Ezek az eredmények összecsengenek a klinikai megfigyelésekkel.

Hibernáció hatása a neuron morfológiára és a memóriára

Miután hibernáció során olyan reverzibilis molekuláris változások történnek (tau protein hiperfoszforiláció), melyek az Alzheimer kórban irreverzibilisen zajlanak, szerző a hibernáció neuromorfológiai és neurokémiai jellemzőit vette górcső alá. Szíriai aranyhörcsög hippocampus vizsgálata hibernáció során nem eredményezett értékelhető-szignifikáns-, illetve az Alzheimer kórban értelmezhető eredményeket. Ebben a fejezetben az ábrák minősége olyan rossz, hogy opponens bírálata során csak a szövegre és a grafikonokra tudott hagyatkozni.

A p21H-Ras fehérje lehetséges szerepének vizsgálata transzgenikus egérben

A transzgenikus állatok neuronjai az ontogenezis vége felé (P14) kezdik magas szinten expresszálni a p21H-Ras fehérjét, mely a neurotrofin jelátviteli mechanizmusokban vesz részt. Az állatok agykérgi volumene szignifikáns növekedést mutat. Piramissejtjeik nagyobbak, a dendritek vastagabbak, a dendrittüskék száma magasabb a vad típusú kontrollokéhoz képest. A piramissejteken végződő afferens axonok száma is növekszik, és a piramissejtek igen jól reagálnak a fizikai aktivitásra. A transzgenikus állattörzs jellemzése (feltehetően) bizonyítja a

neurotrofikus jelátviteli utak fontosságát az agykéreg volumenének és neuronjainak funkciója szempontjából – egyben felveti a lehetőségét annak, hogy a neurodegenerációt ebből az aspektusból meg lehetne előzni. A fejezetben szép és demonstratív ábrák vannak.

Az endokannabinoid rendszer változásai Alzheimer-kórban

Ez a fejezet humán minták analíziséről szól. A minták diagnosztizált betegekből és kontrollként használt tünetmentes elhunytakból származnak. A receptorok nem mutattak szignifikáns változást. A bontóenzimek azonban megváltoztatták lokalizációjukat: a beteg neuronokból mikrogliá sejtekbe kerültek át. A fejezetben szép és demonstratív ábrákat látunk.

A sejtproliferáció megfigyelése és kapcsolata a neurodegenerációval

Szerző sün agyban vizsgálta a BrdU pozitív sejtek számát és eloszlását – az életkor függvényében jelentős számú osztódó sejtet talált. Ezek a referencia-kísérletek a humán amiloid prekursor fehérje neurogenetikus hatásának vizsgálatához: ezen utóbbi kísérleteket a fehérjét erősen expresszáló PDGF-hAPPWt transzgenikus egereken végezte. Kísérleteiben beigazolódott, hogy ingergazdag környezet hatására a fehérje serkenti a sejtproliferációt. Ezek az eredmények összhangban vannak az irodalmi adatokkal.

Differenciálatlan neuronok az emberi szaglórendszerben

A következőkben a tractus olfactorius secretagogin-tartalmú sejtjeinek leírása következik. Ezek a sejtek neuronszerű sejtek, amelyek feltehetően kevésbé differenciáltak és szerepük lehet az Alzheimer-kórra jellemző szaglási defektus kialakulásában. Szerző megvizsgálta a sejtek markereit, a sejtek eloszlását emberi agyban és transzgenikus egerekben. Nem talált jellemző elváltozásokat, amiket oki kapcsolatba lehetett volna hozni a betegséggel. A sejtek eloszlását a plakkok sem befolyásolják (APdE9 transzgenikus egér).

Az extracelluláris mátrix szerepe/változásai Alzheimer-kórban

Szerző részletesen leírja az extracelluláris mátrix kiterjedését és lokalizációját házicsirke, fehérpatkány és ember agyában. Fény-és elektronmikroszkópos képekkel illusztrálja a leírásokat – sajnálatos, hogy itt is előfordulnak rossz minőségű mikrofotográfiák (69., 70., 73., 78. ábrák), melyek semmiféle információt nem közvetítenek. Vannak azonban szép és informatív ábrák is. Az Alzheimer-kór illetve transzgenikus egér (plakkokkal) nem mutat igazán szignifikáns eltéréseket ebben a kérdésben sem.

A „Megbeszélés”

Igen nehéz feladat a szerteágazó vizsgálatokat egy nevezőre hozni. A diszkusszió első részében a prekursor fehérjére felfűzött érvelést találunk: a fehérje expresszió és sejtproliferáció valamint a neuronális morfológia között világos kapcsolatokat lehet felfedezni. Az aprólékos morfometria feltárja azokat az egyébként láthatatlan (patho)morfológiai változásokat, amelyek egészen biztosan lezajlanak a betegség során is. Ebben a tekintetben igen fontosak a transzgenikus állatok: miután a morfológiai elváltozásokat génműködéssel lehet kapcsolatba hozni. Nehezebb a szerző dolga a hibernációval: igen merész állítás ugyanis a hibernációt a korai Alzheimer-kórral kapcsolatba hozni; jóllehet a tau foszforiláció itt is megfigyelhető. Az állatok memóriája azonban nem károsodik, neurodegeneráció sincs, ezért nem gondoljuk, hogy a hibernációt Alzheimer-modellként kellene emlegetni.

Értékes eredmények születtek a p21Ras expresszió vizsgálata során az agykéreg morfológiája tekintetében. A p21Ras génszabályozott mennyiségi növekedése az agykéreg volumenét szignifikánsan megnöveli, a piramissejteket szintén (beleértve a dendrittüske-denzitást) – ami önmagában is érdekes alternatívája (lehetséges ellentételezése) a neurodegenerációnak. Amint azt a szerző említi, humán mintákon is detektálható a p21Ras jelátvivő rendszer aktivációja Alzheimer-kórban. Így a szerző által a transzgen állatban leírt elváltozások használhatók lehetnek az patogenezis magyarázatában.

Érdekesekek a mikroglialis endokannabinoid metabolizmus változásaival kapcsolatos megfigyelések, melyek bizonyítják a mikroglia metabolizmus szignifikáns erősödését – és ahogyan szerző fogalmaz a neuron-glia interakciók károsodását Alzheimer-kórban. Ezek a vizsgálatok egy valódi, humán neuropatológiai jelenséget írtak le, amely egészen biztosan belekerül majd az Alzheimer-kór neuropatológiai leírásaiba.

A sejtproliferációval kapcsolatos vizsgálatok leíró jellegűek, és precizitásuk miatt mindenképpen említésre érdemesek. Ezen a ponton azonban nem sikerült kapcsolatot találni a neurodegenerációval. Hasonlóképpen, nagyon szép és alapos a secretagoin-pozitív sejtek leírása humán szaglórendszerben – az eredmények azonban itt sem mutatnak szoros kapcsolatot az Alzheimer-kórral.

Hasonlóképpen alapos és átfogó vizsgálatokat végzett a szerző az agyi extracelluláris mátrix neurokémijával és lokalizációjával kapcsolatban. Az eredmények bizonyára nagyon hasznosak lesznek a további munkában. Szoros neuropatológiai összefüggést azonban itt sem sikerült találni: a változások valószínűleg inkább általános jellegűek és nem specifikusak az Alzheimer-kór tekintetében.

Mégis, ebből a hatalmas adathalmazból lehetett volna egy koncepciózusabb diszkusszió: sorra lehetett volna venni (kritikai szemszögből) azokat a morfológiai-neurokémiai változásokat (akár

transzgén állatban, akár humán agyban voltak megfigyelhetők), amelyek az Alzheimer-kór neuropatológiájához szorosabban kapcsolódnak, és így valószínűsíthetően a beteg humán agyvelőben is lejátszódnak. Hiányzik egy koncepciózus molekuláris biológiai összefoglalás is – amíg a bevezetésben részletes molekula-leírások vannak, a diskuszióban már csak irodalmi hivatkozásokat találunk; nincs (pedig az eredmények alapján lehetne) molekuláris koncepció a prekursor fehérje, vagy a Ras, vagy az endocannabinoidok, vagy a mátrix molekulák patogenetikai szerepét illetően.

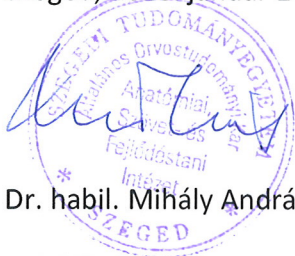
Opponens a következő eredményeket ismeri el a disszertáció eredeti megállapításaiként:

1. Szerző kimutatta és morfometriai méréseivel bizonyította, hogy az amiloid prekursor proteint túlzott mértékben expresszáló egértörzsek közül azok az állatok mutatnak dendrit degenerációt, amelyekben a mutáció következtében plakkok képződnek. Az APP hatása inkább trofikus és neuroprotektív.
2. Szerző kimutatta, hogy a hibernáció során (valószínűleg az intracelluláris transzport lassulása miatt) a piramissejt dendriteken átmeneti atrófia és a szinapszisok számának vélhető csökkenése jelentkezik. Mindezt a tau-fehérje hiperfoszforilációja kíséri. Nem fogadjuk el szerző azon állítását, hogy ez a jelenség az Alzheimer-kórhoz hasonló (de átmeneti) állapotot hoz létre.
3. Szerző kimutatta, hogy a p21Ras túlzott neuronális expressziója jellegzetes morfológiai változásokkal jár, amelyek az agykéreg „hipertrófiáját” jelentik. A sejtek, a dendritek és a dendrittüskék morfológiai változásait precíz morfometriai adatokkal támasztotta alá.
4. Humán agykérgi mintákon figyelte meg azt, hogy Alzheimer-kórban a 2-arachidonoil-glicerol lebontásáért felelős enzim dendritikus koncentrációja csökken, és az enzim mikroglia sejtekben jelenik meg.
5. Morfológiai-neurokémiai vizsgálatai leírták a humán szaglórészletben jelen lévő secretagoin tartalmú bipoláris sejtek lokalizációját, morfológiai és neurokémiai jellemzőit. Kimutatta, hogy a tractus olfactorius secretagoin-pozitív sejtjeinek száma Alzheimer-kórban csökken.
6. Részletekbe menő morfológiai és neurokémiai vizsgálatokkal madár, emlős és humán agyszövetben feltárta az agyi extracelluláris mátrix kémiai összetételét és morfológiai megjelenési formáit. Kimutatta, hogy egyes molekuláris komponensek Alzheimer-kórban megváltoznak.

Szerző a kutatási módszerek hatalmas arzenáljával dolgozik. Morfometriai megfigyelései fontos adatokat szolgáltatnak a neuronális plaszticitás és neurodegeneráció jobb megismeréséhez. Megfigyeléseivel megpróbálja összekapcsolni a molekuláris mechanizmusokat és a mikroszkópban látható képet, amely törekvés (és a minőségi megvalósítás) mindenképpen a neurobiológia jelenlegi élvonalába sorolja a vizsgálatait és eredményeit. Eredményei

meggyőzően hitelek. A doktori mű fő megállapításait az előbbiekben (1-6. pontok) felsoroltam. Hiányosságai nagyrészt stiláris jellegűek: a következtlen írásmód, idegen szavak indokolatlan használata – ezeket a szövegben jelöltem, itt nem kívánom sorolni. Hiányosságként az egyes fejezeteknél említettem az ábrák rossz minőségét, valamint egy szintézis-szerű kitekintés hiányát a diszkusszióban.

Szeged, 2016. január 14.



András

Dr. habil. Mihály András

az MTA doktora

tanszékvezető egyetemi tanár