

## **Dr. Farkas Eszter: Az agykérgi terjedő depolarizáció kórélettani jelentősége**

MTA Doktori Értekezés bírálata

(Dr. Nagy Zoltán)

Az agykérgi terjedő depolarizáció (CSD) jelenségét *Arisztid Leao* 1944 és 47 között megjelent 4 közleménye óta ismerik a kutatók. Ezek a közlemények sok esetben máig érvényes leírását adták a terjedő, depolarizációnak, amit mechanikus, vagy elektromos stimulációval több állatfaj (nyúl, galamb, macska) agykérgében igazolt. Úgy találta, hogy a depolarizációs hullám az ellenkező oldali féltekében is megjelenhet, feltehetően a corpus callosumon át terjedve a kiváltó inger erősségétől függően. Igazolta az agykérgi artériákban a kísérő vasoconstrictiot, majd értágulatot. A negyedik közleményében nem csak a CSD morfológiájával foglalkozott, de előfordulását kapcsolatba hozta az ischaemiás károsodással is. Csupán az utóbbi évtizedek módszertani fejlesztése teremtette meg a lehetőséget a terjedő depolarizáció pontosabb megismerésére. Az állapot jelentőségét aláhúzták azok a klinikai megfigyelések, amelyek szerint a stroke állapotokon kívül a traumás agykárosodásban, a migrén aurájában, a fájdalom bizonyos formáiban és az epilepsziában, az epilepsziás hirtelen halál (SUDEP) kórfolyamatában is szerepe van, vagy lehet.

A növekvő érdeklődést igazolja vissza a PubMed-en szereplő közlemények száma, mely 2020. szeptember 15-ig 4623 publikációt jelentett. Az érdeklődés emelkedése egyértelmű. Amíg az 1944-et követő első évtizedben összesen 17 közlemény jelent meg ebben a témában, addig csak az utolsó évben 271. Farkas Eszter tanárnő tudományos érdeklődése, témaválasztása tehát indokolt és mind elméleti, mind a gyakorlati, a betegellátás szempontjából is fontos.

A bírálatra érkezett értekezés összegezi azt a céltudatos, jól megtervezett kutatói munkát, amit a szerző ebben a témában megjelentetett 17 közleménye igazol vissza. Ezeknek a közleményeknek összesített impakt faktora 81,579 (egy publikációra eső átlaga 4,8). A szerző eredményei már a nemzetközi irodalomban visszaigazolást nyertek. A terjedő depolarizáció kutatását Farkas Eszter tanárnő számos új eredménnyel gazdagította és a további klinikai kutatásokhoz is szempontokat, irányokat mutatott.

Eredményeit rangos folyóiratokban közölte és ezek részévé váltak az SD-val foglalkozó tudományterület ismeretanyagának. A bíráló ezért megjegyzéseit, kérdéseit elsősorban a doktori munkával kapcsolatban kívánja megfogalmazni.

Az értekezés 139 oldalon 8 fejezetben ismerteti a terjedő depolarizáció jelenségeit. A disszertáció gondosan szerkesztett, logikus, az ábraanyag- összesen 93- többnyire több összefüggést is bemutató- igényes, jól érthető, az ábramagyarázatok világosak.

A szerkesztéssel kapcsolatos megjegyzések.

A szerző az agykérgi terjedő depolarizáció kimutatására jelentős módszertani fejlesztést végzett. Ezzel foglalkoznak az értekezés első fejezetei. A terjedő depolarizáció kialakulásának mechanizmusában a metabo-vascularis kapcsolatot, a  $K^+$  hullám terjedésének kimutatását, melyekkel az értekezés későbbi fejezeteiben foglalkozik (6.2) talán a módszertani fejezetekhez kapcsolódóan is lehetett volna foglalkozni.

Az anyag, módszer fejezetben és a későbbi fejezetekben vannak átfedések ez bizonyos szempontból érthető. A fejezetekben az adott probléma felvetését és módszer leírását követően az új adatok, eredmények leírásában a szerző sok helyen azonnal diszkutálja is azokat, ami esetenként megnehezíti az új megállapítások, eredmények követését. Ezt ellensúlyozni igyekszik a szerző azzal, hogy minden fejezet végén megfogalmazza az eredmények újszerűségét és a kutatás távlatait. Ugyancsak egy ilyen törekvést jelent a disszertáció végén, a kutatás távlatainak ismételt összegzésével.

Formai megjegyzéshez tartozik, hogy betűelütést alig találtam a dolgozatban, kritikai megjegyzésem viszont a mondatok szórendjére vonatkozik, sokszor a szórend nem követi az anyanyelv szabályait, ami az angolból „visszafordított” saját cikkeknel gyakran előfordul.

A továbbiakban megjegyzéseimet, kérdéseimet a fejezetekhez kapcsolódóan fogalmaztam meg.

A bevezetés és a célkitűzések (5-13 oldal) fejezetekben magát a jelenséget, az eddigi ismeretek legfontosabb elemeit foglalta össze a szerző. Az SD-t mint egy öngerjesztő jelenséget jellemezi, ami az extracellularis  $K^+$  és glutamát szinthez kötött és a volumenvezetés révén valósul meg (7.oldal).

- *Itt merül fel az olvasóban a kérdés, hogy a szerző magát a jelenséget, annak okát milyen struktúrákhoz tartja elsősorban kapcsolhatónak? A károsodott agykérgi sejtek közül, az*

*astroglia, a neuronok (interneuronok), a vascularis elemek endothel sejtek, vascularis simaizomsejtek mind szerepet kapnak ebben a nem-szinaptikus mechanizmusban, amelynek meghatározó helye talán a neuronok apicalis dendritje. A sejtek energiakrízisének következtében kialakuló csatornaműködés összeomlása, így a  $K^+$  és glutamát kiáramlás talán a meghatározó. A megemelkedett extracelluláris  $K^+$  ion koncentráció és ennek szétterjedése, ahogy ezt a jelenséget nagyon elegánsan a 6. fejezet 6.3.2. ábrán mutatta be a szerző a megemelkedett glutamáttal együtt elégséges magyarázat, vagy más mechanizmus is szerepet játszik? A terjedő depolarizáció tehát ok, vagy következmény?*

- *A 2.3 pontban az SD klinikai jelentőségének nem említette a szerző az epilepsziát, vagy migrént a vizuális aura jelenségeket. Ezekben a kórállapotokban nem látta bizonyítottan az SD keletkezését?*
- *A bevezetőben és több helyen később is a szerző neurondegenerációhoz vezető folyamatról beszél. A degeneráció (lásd neurodegeneratív kórképek) fogalma helyett a stroke irodalomban ischaemiás/hypoxiás sejtkárosodásról, necrosisról, apoptosistról és ezek kombinációiról szoktak beszélni.*

Az optikai elven alapuló terjedő depolarizáció láthatóvá tétele és követhetősége feszültségfüggő festékekkel (RH 1383) az egyik meghatározó lépést jelentett az SD kutatásban. A retina preparátumban kidolgozott módszer elegáns. Ezt alkalmazta a szerző az ischaemiás agykárosodás során kialakuló SD kialakulásának tanulmányozására.

- *Mennyiben módosították Fernandes de Lima és mts 2001-ben közölt módszertanát? Milyen előzményei voltak az RH 1383 alkalmazásának, a módszer mennyiben saját fejlesztés?*

A multimodális regisztrálás lehetőségét a koponyaablak kialakítása tette lehetővé, igaz ez a technika csak akut kísérletekben volt lehetséges. Így az SD kétdimenziós téri megjelenítésére és időbeli követésére, valamint a hozzárendelt további paraméterek regisztrálására is lehetőség nyílt. Különböző agyi ischaemia modellben a  $K^+$  ionváltozást, perfúzió és értónus változás detektálását, lokális pH változást és metabolikus változások regisztrálták. A rágsáló ischaemia modellek közül, a permanens MCA másodlagos ág lezorítást, tranziens 2 ér lezorítást véreztetési hipotenzió kialakításával, illetve a mikorembolizációt alkalmazták. Ezekben a stroke modellekben a pathomechanizmusra vonatkozó ismeretek sokirányúak.

- *Az ischaemiás (és reperfüziós) károsodás kialakulásában a vér-agy gát károsodás, az agyi mikroér endothelium barrier viselkedésének változásai (MMP9 szintézis), a cytotoxikus sejtduzzanat, valamint a reperfüziós jelenségek, a citokin-adhezin rendszer aktivációja, a „sludge” képződés és ennek következményei, illetve a capillaris mikrokeringésben kialakuló változások azok a tényezők, amelyeknek a monitorozása a kutatások megtervezésénél kimaradtak. Ennek voltak koncepcionális okai? Ezek a tényezők az SD genezisében a szerző tapasztalata szerint, a vizsgálati modellekben, mennyiben játszanak szerepet?*

Fontos módszertani megállapítás, hogy a feszültségfüggő festék alkalmas az SD valós idejű közvetlen képi megjelenítése, és a DC valós potenciálváltozásai analóg jelenségek. A módszert alkalmasnak találták a post-ischaemiás SD kimutatására, ami a módszert kijelölte a stroke kutatásban is. A lézer Doppler pásztázó üzemmódú fejlesztett változatával (LASCA) kialakították a duális kétdimenziós méréseket és kiegészítették a monitorozást az oxihemoglobin és szöveti térfogat mérésével. Az adott hullámhosszú visszavert fény (vörös, zöld *intrinsic cortical signal IOS*) meghatározásával bővítve, valós képet lehetett kapni a SD és az áramlási viszonyok összefüggéseiről. Felhívta a figyelmet a szerző az agykéregben a két mérési módszer rétegfüggésére. Az érátmérők vizualizálásának lehetősége további paraméterek regisztrálását tette lehetővé. A szív megállítást követő SD, a térfogat és véráramlás változás követése új eredményeket is hozott, értelmezhetővé vált az anoxiás depolarizáció. Az ischaemiás metabolikus változások következménye az anaerob glikolízis és ennek következtében a laktacidózis, lokális pH csökkenés. Sikertült neutrál-vörös alkalmazásával az SD és a pH változás időbeli alakulását és összefüggéseit kimutatni.

Az 5.1. fejezetben a patkányban kialakított permanens MCAO modellben a terjedő agykérgi depolarizációs hullámok térbeli mintázata került ismertetésre, ezek összefüggése a metabolikus változásokkal. Felmerült kérdések a következők:

- *Mi a magyarázata, hogy a rekurrens SD nem okozott változást a véráramlásban? Milyen bizonyíték van a feltételezett maximális artéria tágulatra?*
- *A modellben az eredmények tanúsága szerint többgócú SD generálódás fordult elő. Ez mennyiben kapcsolódott a feltételezett penumbra területhez, vagy az ischaemiás mag területéből is indulnak depolarizációs hullámok? Lehet, hogy a kompromittált keringésű, a mikroerekben kialakuló foltos áramlás-kiesés az SD kiváltója?*

- *Az SD-k keletkezése a leköttést követő egy óra elteltével volt kimutatható. Az ischaemiás sejteltváltozás az infarktus magban hamarabb kialakul. A neuronok membránjának károsodása gyors folyamat. Kérdés, hogy károsodott agyállomány mennyisége, volumene, vagy a sejtek sűrűsége a kritikus faktor? Mi a szerepe az apicalis dendritek sűrűségének az SD keletkezésében?*

Az 5.2 fejezetben a mikroembolisációs stroke modell elemzésére került sor. A kísérletek során az SD, zöld és piros IOS (vérvolumen, hemoglobinszaturáció) és CBF változás került elemzésre. Ezzel kapcsolatban felmerülő kérdések:

- *Milyen mechanizmussal magyarázható az ischaemiás magtól távol keletkező SD?*
- *A koponyaablakon áthaladó terjedő depolarizációk iránya általában fronto-caudalisnak bizonyult. Ez a megfigyelés hogyan magyarázható? Ebben nincs szerepe a liquor áramlásnak is? A mikroembolusok -hasonlóan a klinikai gyakorlatban ismert embolisatiohoz- egy-egy végartéria ellátási területének perifériáján akadnak el, amit természetesen a mikro-anastomosisok modellálnak. Ebben milyen szerepet játszik a striatum, vagy akár az accumbens mag, ami a lehetséges magyarázatok között felsorolásra kerültek?*
- *Az SD refrakter állapot magyarázatára a pályázó az irodalomban található magyarázatok közül melyiket tartja a legvalószínűbbnek?*
- *Az SD keletkezésénél a hyperaemia kimutatható volt, terjedő ischaemia nem fordult elő, ugyanakkor az oxigén deszaturációja jelentős tényező volt. A meglehetősen összetett folyamatok magyarázatában nem játszik-e szerepet a mikrovasculatúra anatómiája, a patkányagyban ugyanis a penetráló kisarteriák és a precapillaris arteriolák is gazdag anastomosis hálózattal kapcsolódnak egymáshoz?*

Az 5.3 fejezetben a kétoldali arteria carotis communis lezserítése és a véreztetés kombinációja eredményezi az agykárosodást. A globális előagyi ischaemiában kialakuló SD és annak 3 típusának leírása tovább bővítette ismereteinket (rövid tranziens, elhúzódó tranziens és terminális). Itt a hypoperfusio és terjedő ischaemia okozza az agyszövet károsodását. Ebben a modellben elemezték a szöveti acidózis kialakulását és hatását a SD kialakulására és terjedésére. A pH csökkenés tovább rontja a neuronok túlélésének esélyét.

- *Mennyiben van szerepe magának a hypoperfúziós, oligoemiás eredetű, anaerob glikolízisnek, vagy az SD-nek, ahogy ezt a fejezet címe sugallja?*
- *Mire gondol a szerző a savas tartalmú szinaptikus vezikulák említésekor?*

- *A véreztetéses sokk klasszikus hazai vizsgálataiban (Kovách Arisztid, Dóra Eörs ) a mikrokeringés jellegzetes átrendeződése volt igazolható. Volt-e megfigyelés a kéregben a foltokban kialakuló oligaemiára (a vér alakos elemeinek összezsapzódására)?*
- *A pH csökkenése mikroerek szintjén vér-agy gátkárosodást is okozhat. Erre vonatkozóan volt-e megfigyelés a kísérletek során?*

A 6.1. fejezetben a CSD jelenségei során a neurovascularis kapcsolatot tárgyalta a szerző. Ebben a témakörben jelentős teret szentelt az SD mechanizmusára vonatkozóan és számos új megállapítást tett. Részletes, a vizsgálatokat megalapozó irodalmi áttekintést követően foglalkozott a COX1, COX2, EP<sub>4</sub> receptor blokkolás és a DC, illetve az SD morfológiájának alakulásával. Az enzim gátló, receptor blokkoló kezelés az SD elektrofiziológiai jellemzőit elsősorban az ischaemiás állatcsoportban módosította. Az EP<sub>4</sub> receptor blokkoló L161,982 csökkentette a hyperaemia amplitúdóját. A szerző igazolta, az SD-t követően a hyperaemia kialakulásában a prosztaglandinok vasoaktív szerepét, ugyanakkora COX2 hatását nem tudták igazolni. Az EP<sub>4</sub> receptor aktivációja elősegíti az ischaemiában a neuronok túlélését az SD időtartamának rövidítésével.

- *Az E típusú prostaglandin receptorok közül az 1, 3 vasoconstrictor, a 2, 4 vasodilatator. Endothelialis EP<sub>4</sub> receptor agonista (AE1-329) megemeli az eNOS-t és ezen keresztül értágító, javítja az agyi perfúziót. A neuronális EP<sub>4</sub> receptor kiütéssel egérben nő a károsodás nagysága az MCAO modellben (Liang et al. 2011. J.Clin.Invest). Az alkalmazott L161,982 blokkoló mindkét EP<sub>4</sub> receptorra hat? Alkalmazása változtatta-e a károsodás kiterjedtségét?*
- *A EP<sub>4</sub> receptor agonista L902,688 elsősorban az agyi kisereken kifejtett hatásával az ischaemiás eredetű vér-agy gát károsodást mérsékeli (DeMars 2018 Front. Neurosci.). Van ezzel az agonistával tapasztalat az SD keletkezése és terjedése szempontjából?*

A 6.2 fejezet a 5.4 fejezet témájának folytatása.

A 6.3. fejezet a K<sup>+</sup> ion szerepével foglalkozik. Az extracellularis K<sup>+</sup> felszaporodása az astrocyták aktív működésével a feszültségfüggő Ca<sup>++</sup> csatorna megnyitásával a vascularis simaizom sejtek kontrakcióját, ezen keresztül érkontrakciót okoznak. A fluoreszcens K<sup>+</sup> indikátor festékkel (APH-2) a K<sup>+</sup> felszabadulás vizualizálható lett. A szerző ebben a fejezetben elegáns vizsgálatokkal mutatta be az SD és az extracellularis K<sup>+</sup> szintemelkedés összefüggését és ennek hatását a pialis, corticalis kisartéria szűkültre és a csökkenő véráramlásra. A KCl

által kiváltott mezőpotenciál, majd az ismétlődő depolarizációk közvetlenül a  $K^+$  szinttől függenek. A Paxillin, Nimodipin kísérletek a BK csatorna és az L típusú VGCC szerepét tisztázták a kálium által kiváltott érszűkület kialakulásában.

A Nimodipin alkalmazása a SAH-ban általános, a 80-as évek vizsgálatait az elmúlt évtizedben megerősítették. A Paxillin a magas intersticiális  $K^+$  szint mellett is hatásos prevenciót jelent a vasospasmussal szemben, egyben csökkentette az rSD amplitúdóját. Fontos megállapítás, hogy az SD kialakulásában a BK csatornák megnyílása meghatározó szerepet játszik. A szerző adatai megerősítették és újabb értelmezését adták a  $Ca^{++}$  csatorna blokkolókkal szerzett klinikai tapasztalatoknak.

A 7. fejezetben a szerző az életkor hatását vizsgálta az agykérgi terjedő depolarizáció lefutására. Az agyi ischaemiás jelenségeket általában fiatal kísérleti állatokon vizsgálták. A vizsgálatok kiterjesztése az idős állatokra fontos és értékes része a szerző tudományos munkásságának. Visszatérően foglalkozott az életkor és a SD jelenségek kialakulásának az összefüggésével.

- *A testtömeggel jellemzett a rágcsálók, patkányok életkora. Milyen szempontok szerint választották a 3 korcsoportot és miért nem használtak idősebb (súlyosabb) állatokat a kísérletekhez? A nagyobb életkori különbségek talán még nagyobb eltéréseket eredményezhettek volna.*

A SD kiváltását ezekben a vizsgálatokban KCl-dal, elektromos ingerléssel végezték. Vizsgálták az SD jelenségeket kontroll állatokban, 3 korcsoportban és permanens illetve tranzienis előagyi ischaemia modellekben. A jelenségeket elemezték a hypoperfusio, a hyperaemia és az oligoemia szakában. Az elektromos jelenségeket, a látenciát, az SD ismétlődését, az LFP-t, és a terminális depolarizációt. Elemezték továbbá a metabolikus és keringési paraméterekkel. Számos új eredmény született ezekben a vizsgálatokban, amelyek a nemzetközi irodalomban is mint referencia kerülnek idézésre.

- *A dendritikus arborisatio, a dendrittűskék száma az életkorral változik, szerepük viszont nincs a SD kialakulásában és terjedésében. A sejt saját oszcillációja átmenetileg megszűnik, a szinaptikus működéshez ugyanis nem kötött az SD megjelenése. A bemutatott öregedéshez kötött metabolikus változások mellett a strukturális változások mennyiben játszanak szerepet? A sejtsűrűség, az apicalis dendrit sűrűség az astroglia korhoz kötött elváltozásai, a neurovascularis kapcsolatok elemeinek változása mennyiben befolyásolják az SD életkorhoz kötött változásait?*

- *Mit ért a szerző azon a megállapításon, hogy korral az idegrendszer ingerelhetősége gyengül (117 old)? Elképzelhető-e, hogy az öregedés a sejt, illetve mitochondriumok membránjának szintjén az ion csatornák számának, belső arányainak változása révén alakul ki (Strickland at al. Front.Physiol.2019), tehát a változás a korfüggő  $K^+$  kiáramlással van összefüggésben?*

Összefoglalva, a nagydoktori munka egy nemzetközileg is elismert kutatás dokumentuma, az eredményekben, a terjedő depolarizáció kórélettani jelenségeinek számos új összefüggését világította meg a szerző. A disszertáció 9. fejezete összefoglalja ezeket az új megállapításokat. Ezzel a bíráló egyet ért. A kutatás eredményei aligha lennének ilyen meggyőzőek, elegánsak, ha nem támaszkodnának jelentős módszerfejlesztésre is. A legfontosabb eredményeket a következőkben javaslom megfogalmazni:

- 1) Multimodális, optikai elven működő és szimultán regisztrációra képes vizsgáló rendszert hoztak létre, amely alkalmas a mezőpotenciál, a pH, a  $K^+$  koncentráció, a véráramlás, a vérvolumen és a hgb szaturáció képi megjelenítésére, kvantitatív elemzésére, tér és időbeli változások összefüggéseinek feltárására.
- 2) Az SD kóros vasoregulatioval és szöveti acidózissal kísért, esetenként terjedő ischaemiás károsodást okozva. Az AD, SD az ischaemiás depolarizáció, peri-inferktus depolarizáció ugyanazon jelenségkörhöz tartoznak, és egyaránt másodlagos agyszövetkárosodást okozhatnak.
- 3) Az SD –hez csatlakozó vasoconstrictio az extracelluláris  $K^+$  szint emelkedéshez, a dilatáció a  $PGE_2/EP_4$  útvonalhoz kötött. Az ischaemiás lezióban ez a szignalizáció károsodik.
- 4) Az idősödő állapotban az SD kiválthatósága csökken, de a kapcsolódó metabolikus krízis kifejezettebbé válik.

A dolgozat számos új megállapítást tartalmaz, magas színvonalú kutató munka dokumentuma. A doktori munka minden szempontból megfelel az MTA Doktori Szabályzatában megfogalmazott követelményeknek. A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak ítélem.

Budapest, 2020. 09. 23.

Prof. Dr. Nagy Zoltán