

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS BÍRÁLATA

Vélemény Dr. Wittner Lucia „Fiziológiás és epilepsziás szinkronizációs folyamatok vizsgálata humán és rágcsáló agykéregben” címen benyújtott MTA Doktori értekezéséről

Az értekezés felépítése, rövid tartalmi ismertetése:

A magyar nyelven írt doktori értekezés 146 oldal, amely a következő fejezeteket tartalmazza: 3 oldal a rövidítések jegyzéke, 28 oldal a bevezetés, amely tulajdonképpen tartalmazza az irodalmi áttekintést, 4 oldalas célkitűzések felsorolása, 4 oldal az alkalmazott módszerek felsorolása, az eredmények fejezet 30 oldal, a következtetések 4 oldal, az összefoglalás 3 oldal, 2 oldal a köszönetnyilvánítás, 12 oldal az irodalomjegyzés. Ezt követi az értekezés alapjául szolgáló 14 saját közlemények jegyzéke (6-ban első szerző, 4-ben utolsó szerző), végül az értekezéshez fel nem használt saját publikációk listája. Kiemelendő, hogy a saját közlemények többsége nagyon magas impakt faktorú, Q1-s újságban jelent meg.

Az eredeti közlemények száma 39, az összesített impakt faktor 202,7, az összes független idézet száma 1639, h-index 19.

Az epilepszia az egyik leggyakoribb neurológiai megbetegedés. Az epilepsziás agykéregben paroxysmalis aktivitás, rohamok és interictalis tüskék keletkeznek, melynek eredményeként az idegsejtek nagy csoportjának egyszerre történő, túlzott szinkron kisülése alakul ki. Az utóbbi években számos irodalmi adatot közöltek a fiziológiás és epilepsziás folyamat kialakulásának anatómiai hátteréről human hippocampusban és neocortexben. Bár a rágcsálókban végzett vizsgálatok eredményei csak részben hasonlítanak az eddigi humán vizsgálatokéhoz, a rohamok pathomechanizmusának jobb megismerése a megfelelő gyógyszerek felfedezéséhez jelentős segítséget nyújthatnak. Ehhez Dr Wittner Lucia eddigi kutatásai jelentősen hozzájárultak, ezért az értekezés témaválasztása korszerű és rendkívül időszerű.

1. Formai értékelés

Az értekezés formai szempontból jól tagolt, szép kivitelű, gondosan szerkesztett, igen tömör, a nyelvezete nagyon jó. Minden egyes fejezetet – beleértve az irodalmi összefoglalót is, szép színes ábrákkal magyarázza, ami jelentősen megkönnyíti az egyébként igen tömör anyag szakmai megértését, magyarázatuk egyértelmű.

2. Tartalmi értékelés

2.1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A 149 közleményt tartalmazó irodalomjegyzék tanúsítja, hogy az értekezés széleskörű irodalmi adatbázisra épül. Fontosnak tartom kiemelni, hogy ehhez a szerző maga is 14 közleménnyel járult hozzá, 8-ban első szerző.

Az áttekintés elsőként tárgyalja a rohamok, az interictalis tüskék fogalmát, az epilepszia egyes típusainak a definícióját, az egyes – az értekezésben szereplő - betegségek összefüggését az epilepsziával (agydaganatok, focalis corticalis dysplasia, hippocampalis sclerosis, lázgörcs). Részletesen bemutatja a hippocampus és a neocortex anatómiáját, ezek elváltozásait epilepsziában, valamint a gátló interneuronok funkcionális csoportjait. Ismerteti az in vivo, ex vivo és az akut in vitro állatmodelleket, ezek alkalmazhatóságát az egyes vizsgálatokban.

Az irodalmi áttekintést ábrák segítségével is demonstrálja. Összefoglalja a rágsálók, a humán hippocampusban és a neocortexben megjelenő szinkron eseményeket, az epilepsziás aktivitást. In vitro kísérletek alapján bizonyítottnak tekinthető, hogy az emberi agykéregben mind anatómiai, mind elektrofiziológiai szempontból a rágsálókhoz hasonló sejttípusok találhatóak. Ugyanakkor a mikroelektrodás vizsgálatok adatai között ellentmondások is előfordulnak. Az eddigi feltételezések alapján az epilepsziás aktivitás kialakulásának agykérgi epilepsziában a serkentés-gátlás egyensúlyának és a klorid háztartás felborulása lehet az alapja.

2.2. Célkitűzések

A disszertáns fő célkitűzése a fiziológiás és epilepsziás szinkron populációs aktivitások kialakulási mechanizmusainak a vizsgálata rágsálók és az ember agykéregében. Vizsgálni kívánta, hogy mitől válik egy adott agyi régió patológiás szinkron folyamatok gócpontjává, hol a határ a fiziológiás és az epilepsziás aktivitások között, illetve megfejtetni a szinkronizációs folyamatok mechanizmusát, kideríteni a rágsálók és az ember agyában létrejövő oszcillációk különbözőségeit.

A szerző a célkitűzéseket 8 csoportban foglalta össze (mindegyike egy-egy közleményhez kapcsolódik), összesen 37 kérdést tett fel, amire válaszokat várt a vizsgálatok befejeztével.

2.3. Módszerek

Ebben a fejezetben a szerző röviden ismerteti az egyes vizsgálatokban alkalmazott módszereket (betegek, anatómiai módszerek, epilepsziás modellek, genetikai profil, elektrofiziológiai módszerek, két-foton mikroszkópia). Minden módszernél hivatkozik azokra a közleményekre, ahol az egyes módszerek részletes leírása megtalálható. Külön kiemelő, hogy a legtöbb magas impakt faktorú közleményben a disszertáns első-, utolsó-, vagy társszerző, így a módszerek tökéletes ismeretségéhez nem férhet kétség.

Megjegyzés: talán érdemes lett volna néhány adat megemlézése, különösen a betegek fejezetben: a műtetre kerülő epilepsziás és nem epilepsziás betegek (tumoros) száma az egyes humán vizsgálatokban, életkoruk, a terápia rezisztens epilepsziás betegeknél az epilepszia fennállása, rohamok gyakorisága, stb. Mindezek többsége ugyan megtalálható az egyes közleményekben. Hasonlóan a rágsálókban végzett vizsgálatoknál sem található adatok, vagy csak hippocampus, neocortex szeletek szerepelnek. (A módszertani fejezetben nem, az eredmények fejezetben pedig az ábrákon, vagy a szövegben nem mindenütt, vagy hiányosan szerepel az esetszám, szeletszám pl., „a szeletek 10 %-ában fordult elő”, de a 110 oldalon szerepelnek az adatok:” n=1/29, n=//29, n= 3/26 szelet”).

2.4. Eredmények:

Általánosságban elmondható, hogy a szerző az egyes fejezetek elején röviden összefoglalja az eddigi eredményeket, a vizsgálat célját, az alkalmazott módszereket, a végén összegzi, illetve interpretálja az eredményeket. Tulajdonképpen az eredmények és a diszkusszió egyben van. Valamennyi rész az egyes fejezeteken belül egy-egy közleményen alapul.

2.4.1. *A rágcsálók hippocampusában megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás című fejezet*

A fiziológiás éles hullám keletkezési mechanizmusaival kapcsolatos alfejezetben több fontos megfigyelést tett. Megállapították, hogy a hippocampalis SPW-ek (sharp wave-ripple komplexum) túlélő szeletekben is kialakulnak hasonló tulajdonságokkal, mint élő állatban. A C3 régió egy dinamikus változó neuronális rendszer, amely in vitro is, akár egyidejűleg, többféle aktivitás kialakítására képes. A kétféle (T1 és T2), fiziológiás körülmények között spontán megjelenő SPW-ek generálásában mind a serkentő piramis sejtek, mind az interneuronok részt vesznek. A gátló sejteknek az SPW-ek beindításában jelentős szerepük van, közülük is a periszomatikus gátló sejtek szerepe a legfontosabb. A különböző típusú interneuronok differenciált aktivitásával a CA3 régió neuronális hálózata többféle szinkron aktivitás létrehozására képes.

Az interiktális tüskék keletkezési mechanizmusai alfejezet fontos megállapítása, hogy a hippocampus CA3 régiójában a sejtek elektrofiziológiai, anatómiai és összeköttetésbeli tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy ennek a régióknak vezető szerepe legyen egy patológiás szinkronizációs folyamat generálásában. Ebben a folyamatban fontos szerepe van a burst-ölő piramis sejteknek, amelyeknek a megemelkedett serkentő bemeneti tulajdonságai az interiktális tüskék kezdeti szakaszában, a burst tüzelésű kimenete pedig a tüskék felépülési szakaszában van jelentősége.

Az epilepsziás rohamok keletkezésének tanulmányozását (génexpresszió, elektrofiziológiai, anatómiai kísérletek) in vivo kainat modellben, egerekben végezték. Genetikai vizsgálattal felderítették azokat a sejtes folyamatokat, amelyek szerepet játszanak a status epilepticus és a visszatérő rohamok kialakulásában. Ezzel a módszerrel megállapították, hogy a status epilepticust követően nucleáris szignalizációval, erős immunválasszal, sejtpusztulással és növekedési folyamatokkal kapcsolatos korai génaktiváció jelenik meg. A korai aktivációt egy hosszabb ideig fennálló latens szakasz követi, amelyben inkább a gyulladáshoz köthető folyamatok zajlanak, visszatérő rohamok esetén jelentős génaktiváció már nincs.

A hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai háttere alfejezetben a szerző kimutatta, hogy a CA3 piramis sejtek axonjai a hosszanti tengely mentén a hippocampus kb. 2/3-ába vetítenek. A CA3 régió speciális összeköttetési rendszere és kimeneti mintázata kiemelt szereppel bír a hippocampus információ áramlási mechanizmusában. A hippocampus, és ezen belül a CA3 régió sajátos összeköttetési rendszere lehet az anatómiai alapja a SPW-ek keletkezésének, amelyek közvetíthetik a tanulási és memória feladatokhoz kapcsolódó információ áramlást.

2.4.2. *Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás című fejezetben* anatómiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy epilepszia során a humán hippocampusban mind a klorid homeosztázis, mind a serkentés-gátlás egyensúlya megváltozik. A hippocampus több

régiójában (GD, CA1 és CA3) a KCC2 transzporter expressziójának növekedését találták, míg a subiculumban a principális sejtek kis csoportja nem expresszálja a kloridion gradiens fenntartásáért felelős KCC2 transzportert, emiatt ezekben a sejtekben a GABA depolarizáló posztzinaptikus potenciált vált ki.

A hippocampus több régiójában kimutatták, hogy epilepsziában a serkentés-gátlás egyensúlya sérül. A megnövekedett serkentő bemenetek mellett a periszomatikus gátlósejtek ugyan megőrződnek, de funkcionálisan változnak egyrészt az eltűnt kalciumkötő fehérje parvalbumin (PV) miatt, másrészt axonjaik sarjadzanak, amely kompenzációt jelenthet a túlzott serkentés ellen, de egy túlzott szinkronizációt is közvetíthet a principális sejtek felé. A CA2 régióban ez a mechanizmus lehet az alapja az interiktális-jellegű tüskék kialakulásának.

2.4.3. Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás fejezet

Intracelluláris elvezetésekben kimutatták, hogy míg a nem epilepsziás esetekben a sejtek kb. egyenlő arányban válaszolnak az SPA-kra depolarizáló, hiperpolarizáló, illetve hiper-, majd depolarizáló bifázisos válasszal, addig az epilepsziás sejtek esetében kb. 90 %-a depolarizálódik az SPA-k során.

Az intracellulárisan elvezetett sejtek szignifikánsan többet tüzeltek terápia rezisztens epilepsziás mintákban. Az epilepsziás neocortexben nagyobb volt a serkentő szinapszisok sűrűsége, mint a nem epilepsziásokban, a gátlóké viszont ugyanannyi. A kétféle spontán szinkron aktivitás (spontán populációs aktivitás; SPA), illetve a spontán előforduló, in vitro interiktális- jellegű kisülés közül az utóbbi csak epilepsziás betegekben látható, megjelenésük és tulajdonságaik alapján ezek patológiás folyamatok. Azt találták, hogy az epilepsziás neocortexben nagyobb a serkentetőség, és több neuron vonódik be az SPA-k generálásába, mint a nem epilepsziások mintáiban.

Szinkron intracelluláris elvezetéssel és CA2+képzőképzéssel elsőként tudták korrelálni a szomatikus és dendritikus Ca²⁺-jeleket a sejtesten mért akciós potenciálokkal. Megállapították, hogy a rágszálakkal szemben az emberi neocorticalis piramissejtek dendritfája jóval nagyobb, és komplexebb, ami hozzájárul ahhoz, hogy az emberi neuronális hálózatok kódolási és jelfeldolgozási kapacitása magasabb a modell állatokénál.

Az epileptiform aktivitások keletkezési mechanizmusát epilepsziás és nem epilepsziás (tumoros) betegekből származó neocorticalis szeletekben vizsgálták a GABA-erg jelátvitel blokkolását követően megjelenő epilepsziás események tanulmányozásával. Megállapították, hogy a GABA-erg gátlás csökkentésével indukálni lehet az epilepsziás eseményeket.

3. Következtetések

A szerző összeveti a hippocampus és a neocortex közti különbségek eredményeit in vitro preparátumokban, majd elemzi az ember és az állat közti különbségeket. Megállapítja, hogy a kutatáshoz használt állatok vizsgálati eredményeit jól lehet extrapolálni az emberi betegségekre, de kutatásaik során több olyan jelenséggel találkozhatunk, amelyek felhívják a figyelmet a különbségekre.

4. Új megállapítások, amelyeket új tudományos eredményként elfogadok

A rágszálak hippocampusában megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás című fejezetben

A.) A hippocampus, és ezen belül a CA3 régió sajátos összeköttetési rendszere lehet az anatómiai alapja a SPW-ek (sharp wave-ripple) keletkezésének, amelyek közvetíthetik a tanulási és memória feladatokhoz kapcsolódó információ áramlást.

B.) A hippocampus CA3 régiójában a sejtek elektrofiziológiai, anatómiai és összeköttetésbeli tulajdonságai hozzájárulnak ahhoz, hogy ennek a régiónak vezető szerepe legyen egy patológiás szinkronizációs folyamat generálásában.

C.) A status epilepticust követően nucleáris szignalizációval, erős immunválasszal, sejtpusztulással és növekedési folyamatokkal kapcsolatos korai génaktiváció jelenik meg, a latens szakaszban a gyulladáshoz köthető folyamatok zajlanak, visszatérő rohamok esetén jelentős génaktiváció már nincs.

Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás című fejezetben

D.) A kation-klorid transzporterek (NKCC1 és KCC2) által felállított kloridion gradiens megváltozása lehet az oka, hogy a GABA a szokásos hiperpolarizáció helyett depolarizáló választ vált ki a subicularis piramissejtekben az interiktális tuskék során.

E.) A KCC2 fehérje mennyisége a humán epilepsziás betegek hippocampusában megemelkedik a kontrollhoz képest.

F.) Megállapította, hogy a CA2 régióban a serkentés-gátlás egyensúlyának a felborulása okozza azt, hogy a régió képes interiktális tuskéket generálni, és a piramissejtek nagy része depolarizáló választ mutat.

G.) A gyrus dentatusban a parvalbumin (PV) tartalmú periszomatikus gátlósejtek epilepsziában megőrződnek, az axonjaik túlélnek és sarjadzanak, és megnövekedett gátló bemenetet adnak a szomcsesejtekre.

Az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás fejezetben

H.) Intracelluláris elvezetésekben kimutatta, hogy míg a nem epilepsziás esetekben a sejtek kb. egyenlő arányban válaszolnak az SPA-kra depolarizáló, hiperpolarizáló, illetve hiper-, majd depolarizáló bifázisos válasszal, addig az epilepsziás sejtek esetében kb. 90 %-a depolarizálódik az SPA-k során.

J.) Azt találta, hogy az intracellulárisan elvezetett sejtek szignifikánsan többet tüzeltek terápia rezisztens epilepsziás mintákban, az epilepsziás neocortexben nagyobb a serkenthetőség, és több neuron vonódik be az SPA-k generálásába, mint a nem epilepsziások mintáiban.

K.) Szinkron intracelluláris elvezetéssel és CA2+képzőképzéssel *elsőként tudták korrelálni a szomatikus és dendritikus Ca²⁺-jeleket a sejtesten mért akciós potenciálokkal.* Megállapította, hogy a rágsálókkal szemben az emberi neocorticalis piramissejtek dendritfája jóval nagyobb és komplexebb, ami hozzájárul ahhoz, hogy az emberi neuronális hálózatok kódolási és jelfeldolgozási kapacitása magasabb a modell állatokénál.

6. Kérdéseim

1. A „Módszertani” részhez tett megjegyzésem kapcsán kérdésem, hogy például a fénymikroszkópos, az anatómiai és az elektrofiziológia vizsgálatokban, vagy a mikroelektródás vizsgálatokban hány szeletet, vagy sejtet vizsgáltak általában, esetleg átlagolnak (nyilván ez

a kísérleti elrendezéstől, a vizsgált kérdéstől függően más és más lehet)? Az ábrákon egyes szeletekből nyert összes információk szerepelnek (a legjellemzőbb minták demonstrálása), vagy több szeletből hasonló információk?

2. Kainátot alkalmazó epilepsziás modellben az epilepsziás állapotokban egy speciális sejtpusztulási mintázatot láttak, amely mind a serkentő, mind a gátló neuronokat érintette. Ugyanakkor azt találták, hogy az ipsilaterális szelektív interneuron pusztulást mutató hippocampalis területek ugyanúgy képesek voltak interictalis aktivitás generálására, mint contralateralisan, ahol nem volt sejtpusztulás. A megállapítás az volt, hogy a sejtpusztulás nem feltétele az epilepsziás aktivitás kialakulásának. Mi lehet a morfológiai és az funkcionális (elektrofiziológiai) vizsgálatok ezen eltéréseinek a magyarázata?

3. Több irodalmi adat található az epileptogenesis és a programozott sejthalál, ezen belül a caspase rendszerrel (1, 2, 3, 6) összefüggésével kapcsolatban terápia rezisztens temporalis lebeny epilepsziában, sőt állatmodellekben sikerrel kecsegtető gyógyszeres beavatkozások is történtek (Scientific Reports volume 7: 12313 (2017), NeuroMolecular Medicine 9: 129–144 (2007), Ann Neurol. (2021); 90(3):377-390, J Adv Med Biomed Res. 2022; 30(138): 30-38).

Véleménye szerint hozzájárulhat-e az epileptogenesis kapcsán az apoptosissal összefüggő sejthalál, funkciózavar a rágcsálókban és az epilepsziás betegekből nyert human szeletekben végzett komplex vizsgálatok eredményeiben észlelt különbségekhez?

4. Ismert, hogy az epilepsziás folyamatok patomechanizmusának pontosabb megismerése révén az epilepszia kezelésére egyre több új gyógyszert alkalmazunk. Mégis, továbbra sem változott a terápiarezisztens betegek aránya. Az értekezés összes adatainak birtokában lát-e a szerző olyan pontot, patofiziológiai mechanizmust, ahol kedvezően lehetne az epilepsziás folyamatokba beavatkozni?

Összefoglalva

Dr. Wittner Lucia MTA Doktori fokozat elnyerése céljából benyújtott értekezése megfelel az MTA Doktori Szabályzatában megfogalmazott követelményeknek. A munka kiemelkedő, nemzetközileg elismert szakmai-kutató tevékenységen alapul, hiteles adatokat tartalmaz és számos új megfigyelést tartalmaz. Bírálóként meggyőződhettem, hogy a jelölt a PhD. fokozat megszerzése óta kiemelkedően fontos eredeti tudományos megfigyeléseket tett, amivel hozzájárult az idegtudományok, ezen belül az epilepszia kutatás továbbfejlesztéséhez.

Mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsájtását, az értekezés elfogadását, illetve Dr. Wittner Luciának az MTA Doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2022. szeptember 30.

Dr. Fekete István
 egyetemi tanár, az orvostudomány kandidátusa,
 med.habil., emeritus professzor
 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar,
 Neurológiai Klinika

4012. Debrecen, Móricz Zsigmond krt. 22.