



TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT
KOGNITÍV IDEGTUDOMÁNYI ÉS PSZICHOLÓGIAI INTÉZET
DR. WITTNER LUCIA, PHD
1117 BUDAPEST, Magyar Tudósok krt. 2.

LEVÉLCÍM: 1519 BUDAPEST, PF. 286.
TELEFON: +36 1 382 6807
E-MAIL: WITTNER.LUCIA@TTK.HU
WWW.TTK.HU

Válasz Prof. Détári László opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Détári László Emeritus Professor Úr elismerő szavait az MTA doktora címre benyújtott pályázatomban bemutatott tudományos eredményeket illetően. Köszönöm, hogy részletekbe menően áttanulmányozta a pályázatomat és hogy építő kritikai megjegyzéseivel, kérdéseivel a tudomány még mélyebb megértésére sarkall.

Kérem, fogadja válaszaimat az opponensi véleményében megfogalmazott megjegyzésekre, kérdésekre.

Formai megjegyzések

Köszönöm a rövidítések használatára vonatkozó tanácsait, a jövőben meg fogom szívlelni azokat. A magyar-latin írásmóddal kapcsolatban csak annyit jegyeznek meg, hogy talán azért kedvelem jobban a latin írásmódot, mert anatómusként kezdtem a pályafutásomat. Az ábrákkal kapcsolatban pedig, hogy a saját készítésű ábrák között volt, amelyek részben, vagy egészben az értekezés alapjául szolgáló közleményekben jelentek meg, de nem mind. A szövegben leírtak illusztrálására több olyan ábrát is készítettem kifejezetten a nagydoktori értekezéshez (főleg a Bevezetés fejezetben), amelyek eddig sehol nem jelentek meg nyomtatásban. Sajnálom, hogy az ábrák által okozott szövegbeli „töredezetttség” gondot okozott az olvasásban. Lehetett volna a jelenlegi 63 ábra helyett jóval több, kisebb, kevesebb alrészből álló ábrákat is készíteni, amelyeket könnyebb lett volna a szövegbe illeszteni, de a megértés szempontjából célszerűbbnek gondoltam a szövegben egymással kapcsolatos tényeket/adatokat egy ábrán szerepeltetni.

Tartalmi megjegyzések

A szöveg megfogalmazásában elsősorban két dolog vezérelt: az, hogy gördülékenyen olvasható, de ugyanakkor elég tömör legyen. Ahogy a Bíráló is megjegyezte, az értekezésem közel 150 oldal, nem szerettem volna egy irreálisan hosszú dolgozatot írni. Ez az oka annak, hogy például a Módszerek fejezet ennyire rövid lett. Ha minden használt technikát részletesen leírtam volna, akkor a dolgozat valószínűleg közelítette volna akár a 300 oldalt is. Hasonlóképpen, ahogy a Bíráló is megjegyzi, a 14 eredeti tudományos közlemény belefűzése is kezelhetetlenné tette volna az értekezést. Szintén a tömörségre és a gördülékeny olvasásra való törekvésnek lett az áldozata az, hogy az elemszámok nem szerepelnek az Eredmények

egy-egy alfejezeteiben. Belátom, ezt valóban jó lett volna feltüntetni még akkor is, ha az olvashatóság gördülékenysége így csökkent volna. Minden kísérletsorozatban törekedtünk a lehető legmagasabb elemszám elérésére. Az in vitro szeleteket alkalmazó állatkísérleteknél többnyire 60-70 állat (~250 szelet) feldolgozásával született meg egy-egy cikk, az intracelluláris mérésekhez 10-30 sejtet mértünk egy-egy csoportban. Az in vivo intracelluláris sejtöltéseket alkalmazó cikkekben 9-25 állatot használtunk cikkenként (13-34 feltöltött sejtrel). A genetikai vizsgálathoz a gén chip (Affymetrix mouse 430A 2.0) akkori árához mérten csoportonként 2-3 állatot vizsgáltunk, mindegyikben szétválasztva az ipsilateralis dorsalis, ipsilateralis ventralis, contralateralis dorsalis és contralateralis ventralis hippocampusokat. A humán in vitro elektrofiziológiai elvezetésekhez általában 30 páciens/csoport mintáit vizsgáltuk, ahogy az anatómiai vizsgálatokhoz is. Ez utóbbiakat 3-12 kontroll mintához hasonlítottuk. A humán in vitro kísérletekben vizsgált szeletek száma szórta leginkább, 20 és 481 közötti szeletet vizsgáltunk cikkenként. Mind az állatmodellekben, mind a humán kísérletekben a farmakológiai ágenseket 4-10 szeleten alkalmaztuk farmakononként. Sejtszámolást és elektronmikroszkópiai vizsgálatokat általában 3-4 páciens/csoport mintáiból végeztünk. A válaszom végén cikkenként megjelölve megtalálhatók a fontosabb elemszámok.

Köszönöm a Bíráló megjegyzéseit a Bevezetésben leírt témákkal kapcsolatban, ezekre szeretnék reflektálni.

Sokkal több mindent lehetett volna tárgyalni a Bevezetés fejezetben, amelyek érthetőbbé tették volna mind az epilepszia, mind az alapját képező neuronális jelenségek, mind a velük együtt járó patológiák kapcsolatát. Bár vonzó lehetőség lenne egy ezekre vonatkozó, részletes szöveg megírása, orvosi végzettségem, és neurológiai szaktudásom hiányában erre (egyedül) inkább nem vállalkoznék. Az értekezésemben igyekeztem azokra a témakörökre fókuszálni, amelyek megértése elengedhetetlen az eredmények tárgyalásánál.

Sajnálom, hogy nem volt elég érthető az epilepsziás roham, és az epilepszia, mint megbetegedés különbsége. Amennyire én, mint kutató látom, sem a rohamok, sem az epilepsziás megbetegedés definíciója nem teljesen egyértelmű, még a klinikumban dolgozók számára sem. Természetesen a legtöbb epilepsziás roham jól azonosítható. Vannak viszont rohamok, amelyek epilepsziás rohamnak néznek ki, de nem azok, és nem is járnak az epilepsziás rohamokra jellemző elektrofiziológiai jellemzőkkel (például a pszichogén rohamok, hypoglicaemia, vagy a szív működés zavara által kiváltott rosszulletek). Más rohamok pedig egyáltalán nem néznek ki epilepsziás rohamnak, de van elektrofiziológiai jelük, már ha épp méri azt valaki. Ilyenek például (de nem kizárólag) a temporális lebeny epilepsziával járó, főleg a kezet és a szájat érintő automatizmusok, melyek során a páciens az ujjjaival matat, szedeget, tépeget valamit, vagy rágcsál, szája szélét nyalogatja, nyeldegel. Ezek mellett a rohamok mellett könnyű elmenni, ha nem mérünk hozzá EEG-t. Ezért is nehéz feketén-fehéren kijelenteni azt, hogy mi epilepsziás roham, és mi nem. Abban mindenesetre az orvosok és kutatók is megegyeznek, hogy epilepsziás rohamnak az agyi neuronok túlzott, hiperszinkron kisülésével járó görcsjelenség tekinthető (Stafstrom & Carmant, 2015), így tehát ha tipikus elektrofiziológiai jele van a rosszulletnek, az mindenképp epilepsziás rohamnak tekintendő.

Ennél még nehezebb megmondani, ki epilepsziás. Általánosságban elmondható, hogy visszatérő, nem provokált rohamok jellemzik az epilepsziás pácienseket (legalább kettő, legalább 24 órás eltéréssel). Dolgozatomban leírtam a sokszáz klinikust és kutatót tömörítő

ILAE (International League Against Epilepsy) által 2014-ben kiadott hivatalos definíciót (Fisher *et al.*, 2014). Ahogy a Bíráló is észrevette, a definícióban szereplő 2. pont egyáltalán nem egyértelmű első olvasatra, már az eredeti kiadványban sem. Az eredeti, ILAE által kiadott szöveg szerint egészen pontosan így hangzik: „a páciensnek történt egy nem provokált roham, amelyet követő 10 évben ugyanakkora a valószínűsége (több, mint 60%) egy újabb roham előfordulásának, mint a két nem provokált rohamot követően.” Ez a megfogalmazás elsősorban a praktizáló epileptológusok számára készült, akiknek fontos eldönteni, hogy a hozzájuk érkező, egy rohamot átélt páciens esetében fennáll-e az epilepszia, mert nagyon nagy a valószínűsége, hogy visszatérő rohamai lesznek. Ilyen esetek például azok a páciensek, akiknek agyvérzés (stroke) után legalább egy hónappal epilepsziás rohamuk lesz, vagy azok a gyerekek, akiknek egy roham volt, de emellett agyi strukturális és/vagy EEG-eltérést is kimutattak. Szintén ilyen eset az, amikor egy epilepsziás roham után felállítható egy specifikus epilepszia szindróma, amely egy állandósult, megváltozott rohamküszöbvel jár. Ezeknél a pácienseknél a szakorvos jó eséllyel más terápiát fog javasolni, mint azoknál a betegeknél, akiknél ezek a rizikófaktorok nem állnak fenn.

Az agyi tumorok és az epilepszia kapcsolatáról is rengeteget lehetett volna írni, de ez szintén meghaladta volna ezen értekezés kereteit (akárcsak a neurológiai szaktudásomat). Elnézést, hogy a tumorok epileptogenitása nem volt elég világos. A 8. oldalon az epilepsziás betegek szempontjából írtam le a tumorok epileptogenitását, vagyis, hogy az epilepsziás+tumoros kettős patológiájú betegek között leggyakrabban gliális eredetű tumorról, legritkábban az egyéb szervek primer tumorainak metasztázisával találkozunk. Ugyanakkor az is számít, hogy hol keletkezik az adott daganat (akár gliális eredetű, akár metasztatikus tumor), ugyanis a nagyagykéregben és a hippocampusban megjelenő daganatok sokkal nagyobb valószínűséggel okoznak epilepsziát, mint az agytörzsben, vagy a kisagyban megjelenők. A 9. oldalon pedig azon tumoros betegeket foglaltam egy csoportba, akiknél a legkisebb az esélye az epilepszia kialakulásának, tehát a mi szempontunkból a nem epilepsziás, „NoEpi” betegcsoportba tartozó betegek. Ilyenek a primer központi idegrendszeri limfómás betegek, a pia matert érintő elváltozások és a metasztázisos betegek. Valószínűleg szerencsésebb lett volna kicsit jobban kifejtteni.

A rohamindulási mintázatok tekintetében a leírás a 9. oldalon a temporális lebeny eredetű epilepsziás betegek rohamaira vonatkozik, akik esetében az LVF (low voltage fast onset) és a HYP (hypersynchronous onset) a két leggyakoribb mintázat. (A szöveg egészen pontosan: „A temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) a leggyakoribb parciális epilepsziás tünetegyüttes, többnyire fokális rohamokkal jár, melyek sok esetben másodlagosan generalizálódnak (Fisher *et al.*, 2017). Az epileptogén terület a temporális lebenyben található, és legtöbbször a hippocampus is érintett. Többféle rohamindulási mintázatot szoktak megkülönböztetni (1. ábra), ezek közül a leggyakrabban előforduló az alacsony feszültségű, gyors kezdetű roham (low voltage fast onset seizure, LVF), mely egy nagyobb tüskével, és magas frekvenciás oszcillációkkal indul, valamint a hiperszinkron indulású roham (hypersynchronous onset seizure, HYP), mely ritmusosan kialakuló tüskesorozattal indul (Bragin *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2016). Gyakori patológia ezeknél a betegeknél a hippocampalis sclerosis, a gyermekkorban elszenvedett lázgörcs, fejsérülés, corticalis fejlődési rendellenességek (dysgenesis) és tumorok.”)

A 28. oldalon található leírás pedig ennél általánosabb, itt fokális epilepsziákra vonatkozó adatok szerepelnek, amely adatok többsége (de nem kizárólag) mégiscsak a leggyakrabban vizsgált, temporális lebeny eredetű epilepsziában szenvedő betegekből származik. Mivel az értekezésemben a serkentő és gátló folyamatokat tárgyaltam, ezért a két

fent említett, LVF és HYP rohamindulási mintázatokról írtam csak részletesebben, lévén, hogy ezek kapcsolódnak bizonyítottan a gátló (LVF) és serkentő (HYP) folyamatokhoz. Így tehát a két állítás nem zárja ki egymást, csak más kontextusban értendő.

Az éles hullám-ripple komplexumok fiziológiai jelentőségéről ma már meglehetősen sokat tudunk. Természetesen lehetett volna sokkal részletesebben kifejtteni a SPW-ek jelentőségét, és tartalmat tenni az ismeretterjesztő jellegű (és éppen ezért idézőjelbe tett) kifejezés mögé, de ez a témakör is meghaladta volna az értekezés kereteit. Főleg, hogy a dolgozatom a serkentő és gátló neuronpopulációk viselkedésére, az azok által kialakított különböző, fiziológiásnak és patológiásnak tekintett szinkron folyamatok feltárására irányul, nem pedig e szinkronizációk jelentőségére. Így ebben a fejezetben inkább a SPW-ek neuronális mechanizmusaira koncentráltam, amelyeket fontosabbnak ítéltam az eredmények megértése és kontextusba helyezése szempontjából.

„A neocortexből a mediális temporális lebenybe terjedő rohamok során a gátló sejtek aktivitása megnőtt, a serkentő sejteké azonban nem. A következő mondat szerint ugyanakkor az idegsejtek nagy részének megnőtt a tüzelési frekvenciája. A neuronok nagy része tehát gátló?”

Köszönöm a Bírálónak, hogy felhívta a figyelmemet az egymásnak ellentmondó állításokra. Elnézést a pontatlan fogalmazásért, a többszöri átfogalmazás miatt, mely célja az érthetőség lett volna, helytelen megállapítások kerültek bele a szövegbe. Helyesen így lenne a szöveg: „A neocortexből a mediális temporális lebenybe terjedő rohamok előtti kb. 30 másodperces időszakban megfigyelték, hogy a gátló sejtek aktivitása lecsökken, ugyanakkor a serkentő neuronoké nem (Misra *et al.*, 2018). A rohamok alatt az idegsejtek nagy részének megnőtt a tüzelési frekvenciája, az egyes neuronok tüzelési mintázata pedig rendkívül heterogén volt mind a hippocampusban (Babb *et al.*, 1987), mind a neocortexben (Truccolo *et al.*, 2011).”

Mindenki a maga szemszögéből, a maga módszereivel és a maga lehetőségeit figyelembe véve vizsgálja a rohamok kezdetét, így a különböző publikációkat rendkívül nehéz összevetni. A különböző csoportok különbözőképp csoportosítják a rohamokat, mindenki más területet vizsgál, és egészen más módszerrel. A kutatócsoportok nagy részének az a célja, hogy megértse, milyen változások köthetők egy roham indulásához, mely folyamatok indítják el azt. A klasszikus hipotézist, mely szerint a gátlás lecsökken, a serkentés megnő, de legalábbis megmarad, többen is igazolták, amikor a rohamok előtti időszakot vizsgálták (Truccolo *et al.*, 2011; Misra *et al.*, 2018). Abban minden kutatócsoport egyetért, hogy a rohamok ideje alatt általánosan megnő a neuronok tüzelési frekvenciája.

Nagyra értékelem a Bírálónak a Célkitűzések fejezetre vonatkozó javaslatait. Több idegtudományi nagydoktori értekezést is végignéztem példának, és mindegyikben az általam is választott stílusú célkitűzések voltak megfogalmazva. Így utólag nekem is sokkal jobban tetszenek a Bíráló által javasolt, sokkal általánosabb, funkcionális megközelítésű megfogalmazások, ha lehetne, egyértelműen átjavítanám.

A 101. oldalon azt olvassuk, hogy: „mind epilepsziás, mind nem epilepsziás szövetben nem szignifikánsan, de több neuron található azokban a régiókban, amelyekben SPA keletkezik, mint ahol nem (54. ábra)”. A neuronsűrűség adatok az 52. ábrán láthatók, de ettől függetlenül nem helyes úgy fogalmazni, hogy „nem szignifikánsan, de több...”, ahogy olyant

se lenne ildomos írni, hogy „ugyan csak tendenciaszerűen, de növekedett”, amely gyakran felbukkan, igaz nem ebben a dolgozatban, ha a változás a várt irányban következik be.

Egyetérték a Bírálóval, hogy nem szerencsés a megfogalmazás, hogy „nem szignifikánsan, de több” (az eredeti angol szövegben az ennél jóval semlegesebb jelentésű „neuron density was slightly higher” szerepelt). Valóban, az eredmények nem különböznek szignifikánsan, így ennek megfelelően sem a cikkben, sem az értekezésben nem vontunk/vontam le messzemenő különbségeket ebből az adatból. Ugyanakkor érdekes, hogy konzekvensen mind ResEpi, mind NoEpi páciensekben, minden rétegben kicsit magasabb a sejtsűrűség azokon a területeken, ahol SPA generálódik, mint ott, ahol nem. Ezért került bele a közleménybe és az értekezésbe is ez az adat. Valószínű, hogy statisztikailag is igazolni lehetett volna a különbséget, ha növeltük volna az elemszámot, de így is meglehetősen idő-és energiaigényes feladat volt összesen kb. 23 000 sejtet megszámlálni.

A leírtak alapján nem tűnik egyértelműnek a bikukullin hatása az emberi neokortexből származó minták esetében. A 96. oldalon, korábbi vizsgálatokra hivatkozva, spontán megjelenő, interiktális tüskékről ír a Jelölt, epilepsziás betegekből eltávolított minták esetében. A 118. oldalon említett vizsgálatban viszont a bikukullin mellett elektromos ingerlésre is szükség volt az interiktális tüskék kiváltásához. Saját vizsgálataiban, az 50. ábra tanúsága szerint a bikukullin gátolta az SPA-k létrejöttét, és IIS sem volt megfigyelhető. Az 55. ábra ugyanakkor arról tanúskodik, hogy a bikukullin mind a 4 betegcsoportban IIS-t (interiktális spike-ot) illetve rohamot indukált.

Elnézést, hogy a szöveg nem volt elég egyértelmű a bikukullin (BIC) hatására vonatkozóan. A 96. oldalon említett két cikk (Köhling *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2002) fiziológiás oldatban spontán megjelenő szinkron aktivitásokról számol be, amelyeket mindkét csoport interiktális tüskéként azonosít (többek között azért is, mert mindkét csoport csak epilepsziás páciensekből származó mintákon mért). Mi is ilyen spontán interiktális-jellegű eseményeket detektáltunk a humán epilepsziás subiculumban és a CA2 régióban. Ez a két közleményünk (Huberfeld *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2009) jóval a neocorticalis szeleteket alkalmazó munkák (Kerekes *et al.*, 2014; Tóth *et al.*, 2018; Kandrács *et al.*, 2019) előtt jelent meg, amelyekben igazoltuk, hogy nem epilepsziás szövetből származó agykéregben is jelenhetnek meg ehhez hasonló szinkron események. Ezért ezekben a cikkekben mi is az interiktális-jellegű tüske megnevezést használtuk. A hippocampusban keletkező eseményeknél mi nem alkalmaztunk BIC-t, az idézett cikk (Cohen *et al.*, 2002) azonban megmutatja, hogy ezeket az eseményeket blokkolja a BIC hozzáadása.

A humán neocortexben spontán megjelenő, általunk SPA-nak elnevezett szinkron események nagyon hasonlóak a hippocampusban megjelenő szinkron eseményekhez, de ahogy említettem, nem epilepsziás humán neocortexben is megjelennek. Ezért is használtuk a semlegesebb, SPA (Szinkron Populációs Aktivitás) kifejezést. Ezek mellett azonban, kizárólag epilepsziás mintákban, az SPA-nál jóval ritkábban, sokkal nagyobb amplitúdójú, komplexebb események is keletkeznek, ezeket azonosítottuk interiktális tüskéként (mert jobban hasonlítanak a farmakonokkal kiváltott interiktális-jellegű tüskékre, és az élő páciensekben mért tüskékre). Az SPA-k eltűntek BIC hozzáadására, majd az esetek egy részében (27/43 szövet epilepsziás, 15/26 szövet tumoros minták esetében) a hozzáadott BIC nem csak blokkolta az SPA-k megjelenését, hanem egy kicsit hosszabb idő elteltével az SPA-knál (és a spontán jelentkező IID-kenél is) jóval nagyobb amplitúdójú, komplex interiktális-jellegű tüskék vagy rohamok indukálódtak. A spontán megjelenő neocorticalis IID-k esetén

(n=2) pedig azt tapasztaltuk, hogy BIC hozzáadására szintén eltűntek, majd egy 5-10 perc elteltével BIC-indukált, visszatérő rohamok jelentek meg.

A 118. oldalon említett vizsgálatban (Hwa & Avoli, 1991) azt írják, hogy a BIC hozzáadására nem alakultak ki IID-k a humán epilepsziás neocorticalis szeletekben, csak akkor, ha egyúttal elektromos ingerlést is alkalmaztak. Mivel a kísérleti körülményeik (szeletek vastagsága, oldat ionösszetétele, alkalmazott BIC koncentrációja) nagyon hasonlóak a mieinkhez, véleményem szerint a legvalószínűbb, hogy azért nem láttak spontán megjelenő BIC-indukált eseményeket, mert nem vártak elég ideig. A mi eseteinkben gyakran 10, de akár 30 perc is eltelt a BIC adását követően, mire az IID-k és rohamok megjelentek.

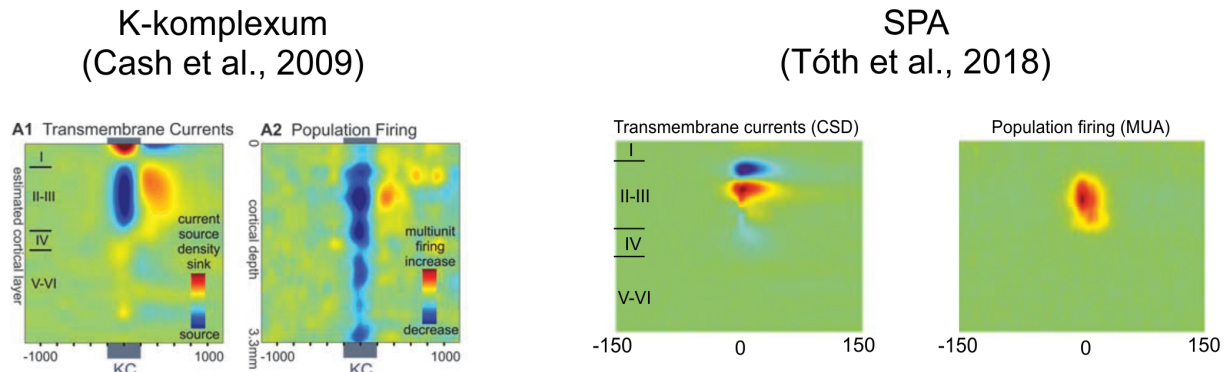
Valószínűnek tartom, hogy a más kutatócsoportok munkáiban megjelenő, akár a hippocampusban, akár a neocortexben keletkező, interiktális tüskéként azonosított szinkron jelenségek ugyanazok (vagy nagyon hasonlóak), mint a mi munkáinkban SPA-nak nevezett események. Ezt azt jelentené, hogy nem köthetők epilepsziához. Ezt bizonyítani azonban nehéz, mert minden csoport kicsit mást és másképp mér, és mivel nem epilepsziás hippocampust nem rezekálnak, a hippocampalis szinkron események epilepsziához köthető voltát nem is lehet ellenőrizni. És hogy a képet tovább árnyaljuk, az ugyanúgy (hasonlóan) kinéző szinkron események mögött állhatnak más mechanizmusok is (pl. a subiculumban a Cl⁻-háztartás, a CA2 régióban pedig a serkentés-gátlás egyensúly felborulása). Talán jó lett volna ezt hosszabban diszkutálni.

Válaszok a kérdésekre

1. A Bevezetés 1.4. fejezetének címe: „Rágcsálók hippocampusában és neocortexében megfigyelhető szinkron események”. Azonban csak az éles hullám-ripple komplexumokról és az epilepsziás aktivitásról esik szó. Számos egyéb szinkron esemény is előfordul ezekben a struktúrákban (pl. teta oszcilláció, alvási orsók, stb.), amelyek kívül esnek a dolgozat fókuszán. Célszerű lett volna ezért leszűkítőbb címet adni a fejezetnek, ahogy a humán adatok esetében történt. Mindenképpen fontos lett volna azonban a lassú kérgi ritmussal és a K-komplexummal foglalkozni, amelyek a neocortexben keletkeznek, generalizáltak, és jelentős neuronális aktivitás növekedéssel járnak. Lehetséges, hogy a nem epilepsziás betegek agyszövetéből készített szeletekben megfigyelt „szinkron populációs aktivitás” (SPA) ilyen működést tükrözött?

Köszönöm a kérdést. Egyetértek a Bírálóval, hogy célszerűbb lett volna egy leszűkítőbb címet adni a fejezetnek. Ahogy fentebb is említettem, valóban lehetett volna még sok egyéb oszcillációs/szinkronizációs folyamattal foglalkozni a Bevezetésben, de az meghaladta volna a dolgozat kereteit. A lassú kérgi oszcilláció (slow oscillation, <1 Hz) és a K-komplexumok kialakulási mechanizmusairól és intracorticalis mintázatairól az emberi nagyagykéregben csoportunk két közleménye is foglalkozik (Cash *et al.*, 2009; Csercsa *et al.*, 2010). Nagyon hasonló mechanizmusokat találtunk a két szinkron oszcilláció/esemény során, így azt a következtetést vontuk le (Cash *et al.*, 2009), hogy a K-komplexum megfeleltethető a lassú oszcilláció egy-egy különálló down-state szakaszának. A K-komplexumoknak és az általunk leírt SPA-knak a celluláris és a hálózati tulajdonságai jelentősen különböznek. Szerencsére ugyanazt az elvezető rendszert használtuk a betegekben, mint az in vitro mérésekben, így elég jól összevethetőek az eredmények. A K-komplexum egy 0.5-1 másodperc hosszúságú esemény, míg az SPA kb. 100 ms (ld. 1. ábra). A K-komplexum

neuronális deaktivációval (MUA csökkenés) jár a kéreg teljes mélységét érintve, míg az SPA aktivációval (MUA növekedés), azt is csak lokálisan, azokra a rétegekre kiterjedően, ahol az SPA megjelenik. A K-komplexumok során a supragranuláris rétegekben egy sink-source pár található (source a 2-3. rétegekben), míg az SPA-k során fordítva, egy source-sink pár a 2-3. rétegekben. Véleményem szerint a K-komplexum és az SPA teljesen más jellegű események.



1. ábra

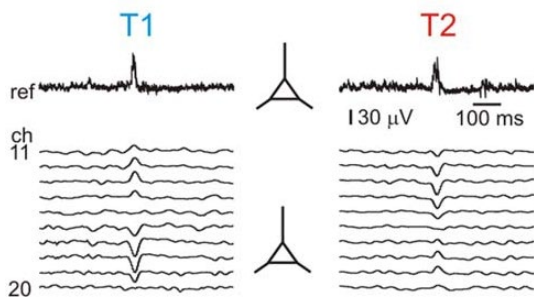
A spontán K-komplexum deaktivációs fázisa kb. 400 ms hosszú, a II-III. rétegekben CSD source és a kéreg összes rétegére kiterjedő sejtüzelés csökkenés látható (bal oldali két panel), míg az SPA összesen kb. 100 ms hosszú esemény, egy sink-source pár látszik a supragranuláris rétegekben, és egy lokális sejtüzelés növekedéssel jár (jobb oldali két panel).

Jelenlegi projektjeink egyike, hogy az in vitro körülmények között megjelenő SPA-knak megfelelően szinkron eseményeket találjunk az in vivo krónikus (epilepsziás páciensekből történt) elvezetésekben. Szabad szemmel nézve vannak hasonló események, de a humán agykéregben mind ébrenlétben, mind alvásban nagyon komplex oszcillációk, hullámok vannak jelen, így elég nehéz elkülöníteni ezeket a relatíve kis amplitúdójú, nem oszcillatorikus jellegű eseményeket. Neurális hálók és tanuló algoritmusok segítségével tervezzük megoldani ezt a feladatot.

2. A 4.3.1. fejezetben olyan izgalmas vizsgálatokról számol be a Jelölt, amelyekben, más kutatócsoportoktól eltérően, nemcsak epilepsziás betegek műtét során eltávolított hippocampális és nagyagyú agyszövet mintáit vizsgálták in vitro körülmények között, hanem tumoros, de nem epilepsziás betegek anyagait is. A mások által végzett kísérletek a spontán megjelenő, szinkron eseményeket az interiktális tüskék modelljének tekintették. A dolgozatban ismertetett vizsgálatokban viszont két, jelentős különbségeket mutató szinkron eseményt írtak le (49. ábra), amelyek közül az első (SPA) minden betegcsoportban előfordult, míg a jóval nagyobb amplitúdójú, gyakran komplex aktivitás (IID – interictal discharge), csak epilepsziás betegek mintáiban volt látható. Jelölt csak ez utóbbit tekinti epilepsziával összefüggő, interiktális tüskének. A kérdésem az, hogy a korábbi vizsgálatokban nem láttak-e kétféle, egymástól ennyire különböző szinkron aktivitást az epilepsziások mintáiban?

Ahogy fentebb is említettem, a hippocampális és nagyagyúkérgi, in vitro körülmények között megjelenő szinkron események epilepsziával való kapcsolatának kutatása nem is olyan egyszerű feladat. Az általam ismert irodalomban nem láttak kétféle spontán, fiziológias oldatban megjelenő aktivitást. Egy közleményben (Huberfeld *et al.*, 2011) találtak interiktális tüskét és egy nagyobb amplitúdójú, preiktális tüskét, amelyeknek eltérő kialakulási mechanizmusát írták le, de ezeket egy módosított, rohamokat indukáló oldatban mérték (magas K^+ és/vagy alacsony Ca^{2+} , Mg^{2+} , illetve magas HCO_3^- és alacsony $NaCl$ -tartalmú oldattal). Véleményem szerint annak, hogy mások nem láttak kétféle eseményt, alapvetően

metodikai oka lehet. Mi egy 24 csatornás, lineáris elrendezésű, 150 µm kontakttávolságú mikroelektrodával mérünk, amely átéri a neocortex teljes vastagságát. Valószínű, hogy a mások által alkalmazott technikák, vagyis az egy-egy elektróda elhelyezése kevésbé fedi fel a kétféle esemény közti különbséget, mint a lineáris elektródáról elvezethető jel, amelyen 4-5 (SPA), illetve 10-15 (IID) csatornán látható az adott szinkron esemény. Erre végeztünk is egy kísérletsorozatot patkány hippocampusban (Hofer *et al.*, 2015), ahol ugyanazon a szeleten, egyidejűleg, egy referenciális egycsatornás rendszerrel és a mi lineáris elektródáinkkal gradiens elvezetést végeztünk (2. ábra). A hippocampusban megjelenő kétféle esemény teljesen ugyanolyannak nézett ki az egycsatornás elvezetésben, holott a mi gradiens elvezetésünkben egyértelműen különböztek, mind CSD mintázat, mind amplitúdó tekintetében.

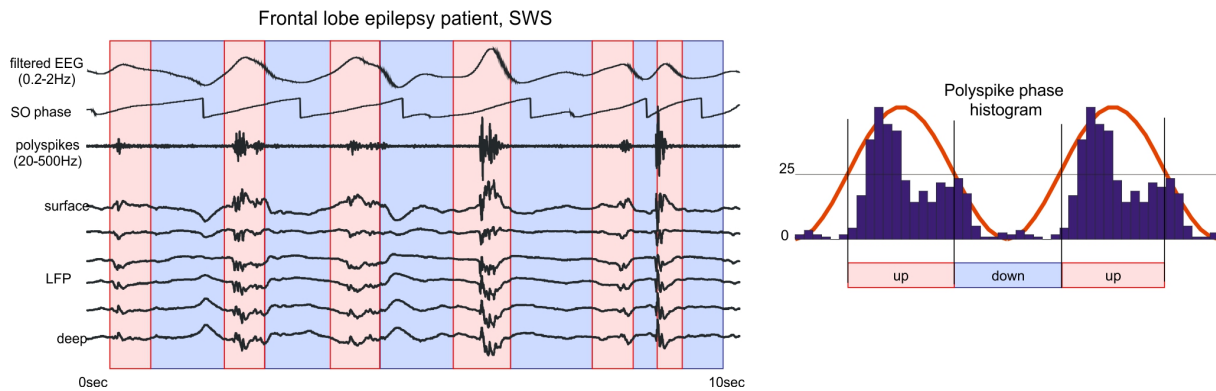


2. ábra

Patkány hippocampus CA3 régiójában végzett szimultán egycsatornás referenciális (ref) és lineáris sokcsatornás (ch 11-20) gradiens elvezetés. Látszik, hogy az egy csatornás elvezetésben a SPW-R komplexumok nagyon hasonlóan néznek ki, míg a sokcsatornás elvezetésben jól elkülöníthetők. A piramissejt rétegben (amelyet sematikus piramissejt ábrázol) a T1 típus mezőpotenciál amplitúdója jóval nagyobb, mint a T2 típusé.

3. Szeretném végül megkérdezni a Jelölt véleményét a felszálló transzmitter rendszereknek az epilepsziás tevékenységben betöltött esetleges szerepével kapcsolatban. Ezek a rendszerek alapvetően módosítják a hippocampális és neokortikális idegsejtek ingerlékenységét és működését. A szeletpreparátumokban ezek a bemenetek érthető módon nem maradnak meg. Figyelmen kívül hagyható-e a hatásuk hiánya, különösen, ha sejtszintű mechanizmusokról, gátlás és serkentés egyensúlyáról beszélünk?

A felszálló transzmitter rendszereknek, valamint az egész agykérget érintő oszcillatorikus jelenségeknek jelentős hatásuk van az agykérgi epilepsziás aktivitásra. Erős kapcsolat van például a NREM alvás és az agykérgi epilepsziás aktivitás között (Halász *et al.*, 2019), az epilepsziás betegeknek gyakran jelentkezik rohama elalváskor/ébredéskor (állapotváltozáskor), illetve éjszaka, NREM alvásban. Különösen gyakoriak az éjszakai rohamok az absence (thalamo-corticalis) epilepsziáknál, a frontális lebony, és a temporális lebony eredetű epilepsziáknál. Nem csak a rohamok, hanem az interiktális tüskék is gyakoribbak NREM alvásban, mint REM fázisban, vagy ébrenlétben. Az interiktális tüskék a NREM alvási fázisok elején kiugróan magas számban jelentkeznek, majd ahogy halad előre a NREM fázis, csökken a számuk (Halász *et al.*, 2019). Ezen túl a lassú oszcillációknak is van egy moduláló hatása, a tüskék többnyire az up-state-ek, vagyis a kéreg serkenthető szakaszában jelentkeznek (saját adat, 3. ábra). Összességében tehát kétség nem férhet hozzá, hogy a felszálló pályák által modulált agykérgi serkentetőség jelentősen befolyásolja a kérgi epilepsziás aktivitást.



3. ábra

A lassú hullámú alvás (slow wave sleep, SWS) fázisai és az interiktális tüskék kapcsolata. Egy frontális lebeny eredetű epilepsziás páciens intracorticalis lineáris mikroelektrodás elvezetés (alsó görbék, felszíni rétegektől a mélyebb rétegekig) és subduralis electrocorticogram (felső görbe, szűrt EEG). Jól látható, hogy az egyszeres (legelső) és az összetett interiktális tüskék (polyspike) az up-state fázisokban jelentkeznek, a downstate-ben nem. Az alsó ábrán a lassú oszcilláció fázisaira normáltuk a tüskék előfordulását. Itt is látható, hogy az up-state elején több tüske jelentkezik, mint a leszálló ágában.

Természetesen ezeknek a komplex hatása nem vizsgálható in vitro körülmények között, egy 500 μm vastag szeletben, bár az élő emberben/állatban is kihívás e felszálló rendszerek szerepének tisztázása, azok összetett hatása miatt. Ugyanakkor az általános serkentetőség könnyen változtatható in vitro körülmények között, akár csak az ionok koncentrációjának változtatásával, vagy az ioncsatornák farmakológiai módosításával. Nem véletlen, hogy ezekkel a módszerekkel epilepsziás aktivitást is ki lehet váltani, nem epilepsziás állatból/emberből származó szeleteken is. Egy agyszelet (értelemszerűen) sose lesz olyan komplex rendszer, mint az élő organizmus, így tisztában kell lennünk a modellünk határaival. Ha megfelelő kontrollhoz (a mi esetünkben az elérhető legjobb kontrollhoz, a tumoros, nem epilepsziás betegekből származó mintákhoz) hasonlítjuk az epilepsziás szövetet, akkor mégiscsak tudunk mondani valamit a serkentés-gátlás egyensúlyáról, a különböző neuron populációk, serkentő/gátló receptorok szerepéről a szinkron aktivitások kialakításában. Ha mást nem, legalább azt, hogy az epilepsziás neuronhálózat/ioncsatorna/transzporter/stb. rendszer miben tér el a nem epilepsziástól. Véleményem szerint nagyon fontos, hogy az eredményeinket/hipotéziseinket, ha lehet, ellenőrizzük igazi epilepsziás páciensekben, ahol talán a megfelelő, nem epilepsziás kontroll hiánya mellett is megtudhatunk valamit az interiktális tüskék és a rohamok kialakulásának mechanizmusairól. Persze ez nehéz, és nagy munka, de csak így kerülhetünk közelebb az emberi betegség megértéséhez.

Szeretném még egyszer megköszönni a Bírálónak az értekezésemre szánt idejét, energiáját és építő javaslatait.

Budapest, 2022. 11. 23.

Wittner Lucia

Dr. Wittner Lucia
wittner.lucia@ttk.hu

Referenciák

- Babb TL, Wilson CL & Isokawa-Akesson M. (1987). Firing patterns of human limbic neurons during stereoencephalography (SEEG) and clinical temporal lobe seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **66**, 467-482.
- Bragin A, Wilson CL, Fields T, Fried I & Engel J, Jr. (2005). Analysis of seizure onset on the basis of wideband EEG recordings. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 59-63.
- Cash SS, Halgren E, Dehghani N, Rossetti AO, Thesen T, Wang C, Devinsky O, Kuzniecky R, Doyle W, Madsen JR, Bromfield E, Eröss L, Halász P, Karmos G, Csercsa R, Wittner L & Ulbert I. (2009). The human K-complex represents an isolated cortical down-state. *Science* **324**, 1084-1087.
- Cohen I, Navarro V, Clémenceau S, Baulac M & Miles R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* **298**, 1418-1421.
- Csercsa R, Dombovári B, Fabó D, Wittner L, Eröss L, Entz L, Sólyom A, Rásonyi G, Szűcs A, Kelemen A, Jakus R, Juhos V, Grand L, Magony A, Halász P, Freund TF, Maglóczky Z, Cash SS, Papp L, Karmos G, Halgren E & Ulbert I. (2010). Laminar analysis of slow wave activity in humans. *Brain* **133**, 2814-2829.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M & Wiebe S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**, 475-482.
- Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE & Zuberi SM. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58**, 522-530.
- Halász P, Bodizs R, Ujma PP, Fabó D & Szűcs A. (2019). Strong relationship between NREM sleep, epilepsy and plastic functions - A conceptual review on the neurophysiology background. *Epilepsy Res* **150**, 95-105.
- Hofer KT, Kandrás A, Ulbert I, Pál I, Szabó C, Héja L & Wittner L. (2015). The hippocampal CA3 region can generate two distinct types of sharp wave-ripple complexes, in vitro. *Hippocampus* **25**, 169-186.
- Huberfeld G, Menendez de la Prida L, Pallud J, Cohen I, Le Van Quyen M, Adam C, Clémenceau S, Baulac M & Miles R. (2011). Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci* **14**, 627-634.
- Huberfeld G, Wittner L, Clémenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R & Rivera C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* **27**, 9866-9873.
- Hwa G & Avoli M. (1991). The Involvement of Excitatory Amino Acids in Neocortical Epileptogenesis - NMDA and Non-NMDA Receptors. *Exp Brain Res* **86**, 248-256.
- Kandrás A, Hofer KT, Tóth K, Tóth EZ, Entz L, Bagó AG, Eröss L, Jordán Z, Nagy G, Fabó D, Ulbert I & Wittner L. (2019). Presence of synchrony-generating hubs in the human epileptic neocortex. *J Physiol* **597**, 5639-5670.

- Kerekes BP, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, Pálfi D, Bagó A, Spitzer K, Rózsa B, Ulbert I & Wittner L. (2014). Combined two-photon imaging, electrophysiological and anatomical investigation of the human neocortex, in vitro. *Neurophotonics* **1**, 011013(011011-011010).
- Köhling R, Lucke A, Straub H, Speckmann EJ, Tuxhorn I, Wolf P, Pannek H & Ooppel F. (1998). Spontaneous sharp waves in human neocortical slices excised from epileptic patients. *Brain* **121 (Pt 6)**, 1073-1087.
- Misra A, Long X, Sperling MR, Sharan AD & Moxon KA. (2018). Increased neuronal synchrony prepares mesial temporal networks for seizures of neocortical origin. *Epilepsia* **59**, 636-649.
- Stafstrom CE & Carmant L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**.
- Tóth K, Hofer KT, Kandrás A, Entz L, Bagó A, Eröss L, Jordán Z, Nagy G, Sólyom A, Fabó D, Ulbert I & Wittner L. (2018). Hyperexcitability of the network contributes to synchronization processes in the human epileptic neocortex. *J Physiol* **596**, 317-342.
- Truccolo W, Donoghue JA, Hochberg LR, Eskandar EN, Madsen JR, Anderson WS, Brown EN, Halgren E & Cash SS. (2011). Single-neuron dynamics in human focal epilepsy. *Nat Neurosci* **14**, 635-641.
- Weiss SA, Alvarado-Rojas C, Bragin A, Behnke E, Fields T, Fried I, Engel J, Jr. & Staba R. (2016). Ictal onset patterns of local field potentials, high frequency oscillations, and unit activity in human mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* **57**, 111-121.
- Wittner L, Huberfeld G, Clémenceau S, Eröss L, Dezamis E, Entz L, Ulbert I, Baulac M, Freund TF, Maglóczy Z & Miles R. (2009). The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain* **132**, 3032-3046.

Elemiszámok a különböző publikációkban (az értekezésben való leírás sorrendjében):

Hofer et al., 2015.

68 állat (patkány), 274 szelet
farmakológiai kísérletek: 5-10 szelet/farmakon
43 intracellulárisan elvezetett sejt
71 klaszterezett gátlósejt

Wittner and Miles 2007.

70 állat (tengerimalac), kb. 250 szelet
extracelluláris elvezetés: 40 szelet
farmakológiai kísérletek: 5-12 szelet/farmakon
egyidejű extra- és intracelluláris elvezetés: 62 sejt
16 feltöltött és 3 dimenzióban rekonstruált sejt

LeDuigou et al., 2005.

62 állat (egér), 80 szelet
(23 corticohippocampalis, 26 CA3 longitudinális, KA beadás után: 10 ipsilateralis, 15 contralateralis, 6 longitudinális hippocampalis szelet)
13 intracellulárisan elvezetett sejt
anatómia: 3 KA-injektált, 3 kontroll állat

Motti et al., 2010.

11 állat (egér): 6 KA-injektált, 3 NaCl-injektált, 2 kontroll

Wittner et al., 2006.

9 állat (patkány), 13 in vivo intracellulárisan töltött sejt

Wittner et al., 2007.

25 állat (patkány), 34 in vivo intracellulárisan töltött sejt
1 intracellulárisan töltött sejt 3 dimenziós rekonstruálása

Huberfeld et al., 2007.

27 epilepsziás páciens, 145 szelet
102 intracelluláris elvezetés
farmakológiai kísérletek: 4-5 szelet/farmakon
sejtszámolás 6 páciensből
13 intracellulárisan töltött sejt addicionális KCC2-festéssel

Wittner et al., 2009.

13 epilepsziás páciens, 1 kontroll, 2 kontroll majom (makákó)
20 szelet
19 intracelluláris elvezetés
3 intracellulárisan töltött sejt, abból 1 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója
sejtszámolás 7 páciensből és a 2 majomból
elektronmikroszkópia: 3 epilepsziás páciens, 1 kontroll
elemzett sejttestek: kontroll: 28 sejt, nem szklerotikus epilepsziás minták: 21 és 18 sejt,
szklerotikus minta: 10 sejt

Tóth et al., 2018.

82 páciens (49 epilepsziás, 33 tumoros)
481 szelet (287 epilepsziás, 194 tumoros szövetből)
farmakológiai kísérletek: 4-9 szelet/farmakon/páciens csoport
33 intracellulárisan elvezetett sejt (17 epilepsziás, 16 tumoros szövetből)
9 intracellulárisan töltött sejt, abból 4 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója
NeuN-sejtszámolás 2-2 páciensből (14 202 sejt epilepsziás, 8 633 sejt tumoros szövetből)
PV-sejtszámolás 3-3 páciensből
elektronmikroszkópia 3-3 páciensből (757 szinapszis epilepsziás, 679 szinapszis tumoros szövetből)

Kerekes et al., 2014.

7 páciens (4 epilepsziás, 3 tumoros)
22 szelet
Ca²⁺-szignál elvezetés: 55 sejt epilepsziás, 31 sejt tumoros szövetből
7 intracellulárisan elvezetett sejt, 2 sejt loose patch elvezetéssel
4 intracellulárisan töltött sejt, abból 1 sejt 3 dimenziós rekonstrukciója

Kandrás et al., 2019.

49 páciens (30 epilepsziás, 19 tumoros)
69 szelet (43 epilepsziás, 29 tumoros szövetből)
intracorticalis terjedés vizsgálata 12 szeletben
klaszterezett sejtek száma: 384 sejt epilepsziás (193 sejt/16 szelet/13 páciensből kontroll körülmények között, 191 sejt/18 szelet/15 páciensből BIC alatt), 349 sejt tumoros szövetben (182 sejt/14 szelet/11 páciens kontroll, 167 sejt/14 szelet/10 páciens BIC)

Wittner et al., 2005.

32 epilepsziás páciens, 3 kontroll
PV sejtszámolás 6 páciens, 3 kontroll
elektronmikroszkópia: 5 páciens, 3 kontroll

Karlócai et al., 2006.

32 epilepsziás páciens, 12 kontroll
Western blot: 9 páciens, 4 kontroll
elektronmikroszkópia: 3 páciens, 2 kontroll (3 hippocampalis terület: GD, CA3, CA1)

Wittner és Maglóczky 2017.

Összefoglaló cikk kiegészítve új adatokkal és ábrákkal (Ludányi et al., 2008, Maglóczky et al., 2010, Wittner et al., 2001, 2002, 2005, 2009)
Összesen kb. 35 epilepsziás páciens és 12 kontroll
elektronmikroszkópia összesen kb. 12 páciens és 4 kontroll