

OPPENENSI VÉLEMÉNY

Wittner Lúcia Veronika: “Fiziológiás és epilepsziás szinkronizációs folyamatok vizsgálata humán és rágcsáló agykéregben” c. akadémiai doktori értekezéséről

Általános megjegyzések

A nagyon szép kiállítású dolgozat a Jelöltnek az elmúlt két évtizedben az epilepszia kutatás területén elért eredményeit foglalja csokorba. A téma igen nagy jelentőségű, mert világszerte több tízmillió ember szenved ebben a betegségben, és ennél is sokkal nagyobb azoknak a száma, akik életükben legalább egyszer átesnek egy görcsrohamon. Az epilepszia, mint neurológiai megbetegedés nagyon nagy változatosságot mutat, a kiváltó okok, a kezelhetőség és a prognózis tekintetében. A háttérben álló sejtszintű mechanizmusok, a betegség heterogenitása miatt nem teljeskörűen feltártak, annak ellenére, hogy általánosságban elmondható, hogy a serkentés és a gátlás egyensúlyának felbomlása vezet a rohamok kialakulásához. A kutatások számára további nehézséget jelent, hogy az emberi agy komplexitása jóval felülmúlja a modell állatokét, még a főemlősökét is, így az állatkísérletekben elért eredmények transzlációja jelentős nehézségekbe ütközik. Ezért különösen nagy értéke a dolgozatnak, hogy műtét során eltávolított emberi agyszöveten is végeztek vizsgálatokat, és ezek között kontrollnak tekinthető, epilepszia által nem érintett minták is szerepeltek.

A dolgozatban foglalt, szerteágazó, modern módszerekkel, jelentős hazai és nemzetközi kollaborációban végrehajtott vizsgálatok érdemei és eredményei vitathatatlanok, amelyet a magas presztízsű folyóiratokban megjelent cikkek is alátámasztanak. A dicsérő szavak mellett azonban az opponensnek az is feladata, hogy kritikával illesse a dolgozatot, és felvessen tisztázandó kérdéseket.

Formai megjegyzések

A dolgozat terjedelme 129 oldal. Az egyes fejezetek oldalszámainak felsorolása azonban meglehetősen félrevezető, mivel a dolgozatot a valóban nagyon tetszetős, nagyon szépen szerkesztett ábrák uralják. Az ábrák többsége egész oldalas, és ez helyenként zavaróan töredezetté teszi a szöveget. Egyes oldalakon csak féloldali szöveg olvasható. Az ábrák többsége a Jelölt megjelent publikációiból van átvéve, és esetenként több ábra összefűzésével kialakítva. Ezek az ábrákon nincs forrásmegjelölés, de vélhetően az adott fejezetcímbe szereplő cikkből származnak. Az ábrák szövegbe illesztése nem erőssége a Word szövegszerkesztőnek, az egész oldalas ábrák kiküszöbölik ezt a problémát, de rontják az olvashatóságot.

A 129 oldal a következőképpen oszlik meg: Tartalomjegyzék 2 oldal, Rövidítések jegyzéke 3 oldal, Bevezetés: 28 oldal 12 ábra, Célkitűzés: 4 oldal, Módszerek: 4 oldal, Eredmények: 78 oldal, 41 ábra, Következtetések: 4 oldal, Összefoglalás: 3 oldal, Köszönetnyilvánítás: 2 oldal. A dolgozatot a 147 idézett irodalom, és a Jelöltnek az értekezés megírásához felhasznált 14 dolgozatának és további 20, epilepsziával és szinkronizációs folyamatokkal foglalkozó, de fel nem használt publikációjának felsorolása zárja. A dolgozat alapjául szolgáló cikkek többségében magas impakt faktorú folyóiratban jelentek meg. Közülük 6 elsőszerzős, 4 utolsószerzős, és 4 egyéb cikk. Utóbbiak közül egy megosztott elsőszerzős. Ezeknek a cikkeknek az összesített impaktfaktora közel 62. A jelölt összességében imponáló tudományos teljesítménnyel rendelkezik, cikkeire 1867 független idézet érkezett, h-indexe: 21. Ez utóbbi két adat már a dolgozat benyújtása óta is jelentősen emelkedett (1639 és 19 volt).

Sajtóhiba, elütés gyakorlatilag nincs a dolgozatban. Az írásmód egységes, bár Bíráló az anatómiai nevek kivételével a magyaros írásmódot preferálja: neokortex, hippocampus, Így kevésbé tűnne furcsának a „hippocampalis” melléknév.

Hasonlóképpen furcsa a „skalp EEG” kifejezés a valóban sokkal hosszabb, „hajás fejbőrrel elvezetett EEG” helyett. Esetleg lehetett volna a Rövidítésjegyzékben definiálni, hogy az EEG mindig az ilyen elvezetést jelenti, szemben az „elektrokortikogram”-al, ami az agykéreg felszínéről történő elvezetésre utal. Ez utóbbi a Rövidítésjegyzékben „electrocorticoqram”-ként szerepel, míg az EEG definíciója „elektroencephalogram”.

Az SPW-t az irodalomban inkább csak a „sharp wave” események megjelölésére szokták használni, a „sharp wave-ripple” komplexumokra inkább SPW-R, vagy SWR formában szoktak utalni. Találhatók felesleges elemek is a Rövidítésjegyzékben. Nem valószínű például, hogy a „H” általánosan elfogadott, és a szövegben sokszor előforduló rövidítése a „hilus”-nak, vagy az „O” az „oriens”-nek, a „P” a „stratum pyramidale”-nek, a „R” a „stratum radiatum”-nak. Ezeket Bíráló csak a 19. ábrán fedezte fel, ahol viszont fel voltak oldva, tehát indokolatlan őket itt is feltüntetni.

Tartalmi megjegyzések

A dolgozat átmenetet képez a Bíráló által ismert klasszikus és a tézis jellegű dolgozatok között. A tézis jellegű dolgozatba befűzve megtalálhatók a dolgozat alapjául szolgáló publikációk és a szöveg igazából csak ezek logikai egymásra épülését írja le, illetve közös diszkussziót tartalmaz, az elvégzett kísérletekből levonható következtetésekkel együtt. Ebben a dolgozatban nem szerepelnek mellékletként az eredeti publikációk, de az egyes fejezetek sincsenek annyira kifejtve, mint egy klasszikus értekezésben.

A dolgozatban szereplő kísérletek három téma köré csoportosulnak: 1. rágcsálók hippocampusában megfigyelhető fiziológiás és epileptiform aktivitás, 2. az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás, 3. az emberi nagyagykéregben megjelenő fiziológiás és epileptiform aktivitás.

A **Bevezetés** nem eléggé tagolt, így a szép ábrák ellenére nehezen követhető. Epilepsziakutatásban nem jártas neurofiziológus számára az elolvasása után sem lesz világos az epilepsziás roham és az epilepszia, mint betegség elkülönítése, nem beszélve az egyéb rohamokról, amelyeket fontos megkülönböztetni az epilepsziás rohamoktól. A Fisher et al, (2014) cikkből átvett epilepszia definíció három feltételt sorol fel, amelyek közül legalább egynek teljesülnie kell a pozitív diagnózishoz. A feltételek 2. pontja az eredeti szövegben sem érthető pontosan, de a dolgozatban még kevésbé: „a páciensnek történt egy nem provokált rohama, amelyet követő 10 évben nagy a valószínűsége egy újabb roham kialakulásának;”. Hogyan lehet az alapján epilepsziásnak nyilvánítani egy beteget, hogy az elkövetkező 10 évben milyen valószínűséggel lesz újabb rohama?

Több kérdés különböző helyeken is felbukkan egymástól eltérő válaszokkal, ami arra utal, hogy a különböző publikációkból származó részinformációk összefésülése nem sikerült tökéletesen.

Például a különböző agyi tumorok és az epilepszia kialakulásának gyakoriságával kapcsolatban a 8. oldalon az olvasható, hogy a legkevésbé epileptogén daganatok az egyéb szervekben kialakuló daganatok metasztázisai, illetve kicsit lejjebb ebbe a körbe sorolja a kisagyi és az agyalapi területeket. A 9. oldalon viszont az szerepel, hogy a legkevésbé epileptogének a vékony agyhártyát érintő tumorok, az elsődleges CNS limfóma és végül megemlíti a metasztázisokat is.

A 9. oldalon megtudjuk, hogy többféle rohamindulási mintázatot különböztetnek meg, de a két leggyakoribb az LVF (low voltage fast onset) és a HYP (hypersynchronous onset). A 28. oldalon viszont már hét rohamindító mintázatról esik szó, amelyek közül az LVF a leggyakoribb, a HYP viszont kizárólag mediális temporális lebeny eredetű epilepsziás betegekben fordul elő.

A 21. oldalon, az „Éles hullám-ripple komplexumok” című fejezetben szerepel egy olyan mondat, ami inkább egy népszerű tudományos cikkbe illene, még akkor is, ha az általam is igen nagyra becsült Buzsáki György könyvéből származik „A SPW-ek, mint neuronális populációs események, alkalmasak arra, hogy a hippocampus által megkapott és feldolgozott információt „kis csomagocskákba” rendezzék, amelyek ilyen formában haladnak egyik helyről a másikra.” Az eredeti könyvben valószínűleg tartalommal is meg lett töltve ez az állítás, így azonban nem sok értelme van.

A 28. oldalon az látható, hogy a neokortexből a mediális temporális lebenybe terjedő rohamok során a gátló sejtek aktivitása megemelkedik, a serkentő neuronoké viszont nem. A következő mondat szerint ugyanakkor az idegsejtek nagy részének megnőtt a tüzelési frekvenciája. A neuronok nagy része tehát gátló?

A **Módszerek** fejezet nagyon szűkszavú, igen kevés információt tartalmaz. Itt hiányoznak leginkább a nem mellékelt közlemények, amelyekben ezek az módszerek nyilván részletesen le voltak írva. Lehet persze, hogy 14 közlemény becsatolása kezelhetetlenül vastaggá tette volna a dolgozatot. Az Eredmények fejezetben általában szerepel valamelyes információ a kísérletek és mérések végrehajtásának körülményeiről, de például, a genetikai profil vizsgálata sem a módszer leírásból, sem a 4.1.2.2. fejezetben leírt kísérlet ismertetéséből sem világos. A szeletpreparátumoknál a fiziológiás oldat feltehetően CSF-et jelent, jobb lett volna azt írni, de az összetétele sem mellékes, ahogy az sem, hogy pl. karbogénnel bubborékoltták-e át a tápfolyadékot.

Szokatlan a **Célkitűzések** fejezet is. Ez természetesen általában utólag készül, hogy az eredmények illeszkedjenek a feltett kérdésekhez. Itt azonban nem igazán történik próbálkozás arra, hogy legalább egy gondolatmenetre legyenek felfűzve az egyes célok. Ehelyett a Jelölt végig veszi a cikkeit, és kiírja belőle az eredményeket kérdés formájában. Sokszor már az is segítene, ha általánosabb lenne a megfogalmazás. Pl. „Előfordulhat-e, hogy egyes subicularis piramissejtekből hiányzik a kloridion gradiens felállításáért felelős KCC2 transzporter fehérje?” Ehelyett jobb lenne: „Játszhat-e szerepet a módosult kloridion gradiens az interiktális tüskék kialakulásában?”

Hasonlóan a helyzet a „Hippocampalis aktivitások anatómiai háttere...” c. részben. A három, partikuláris eredményre utólag rákérdező mondatok helyett szerencsésebb lenne csak azt írni: „Milyen anatómiai sajátosságai vannak a CA3 piramissejtek végződéseinek?”

Vagy: az „Epilepsziás rohamok mechanizmusának vizsgálata rágcsló hippocampusban” részben feltett, apróbb részletekre vonatkozó kérdések helyett egyszerűen lehetett volna azt írni, hogy. „Milyen sajátosságai vannak a kainát hippocampalis beadásával kiváltott epilepsziának in vivo és in vitro? Milyen génexpressziós és anatómiai változásokat indukál a kezelés?”

Ezeknél a problémáknál sokkal súlyosabb hiányosság, hogy az „**Eredmények**” fejezetben szinte sehol se szerepelnek az esetszámok. Hány állatból származnak az adatok, hány sejtet regisztráltak, hány szeleten voltak le valamilyen következtetést, a szeleteket hány állatból nyerték, hány emberi mintát vizsgáltak, stb. Nem tudjuk meg azt sem, hogy az ábrákon SD vagy SEM szerepel. Az eredmények így

kvalitatívává válnak, kvantitatív helyett. Az eredeti közleményekben feltehetően szerepelnek a hiányzó adatok, de a dolgozatban is fel kellett volna tüntetni őket.

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.

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.

A **Következtetések** fejezet igen rövidre sikerült, bár fontos, általános kérdéseket érint. Hiányoltam viszont egy olyan Megvitatás fejezetet, ahol a Jelölt összefogó képet ad az általa elért új eredményekről, ütközteti, vagy csak összehasonlítja azokat az irodalomban fellelhető adatokkal. Ennek valószínűleg ugyancsak a kissé szokatlan, se tézises, se klasszikus értekezés forma az oka. Az egyes fejezetek végén olvasható ugyan néhány bekezdés, ami összeveti az eredményeket a korábbi irodalmi adatokkal, de ez nem pótolja a dolgozatban szereplő kísérletek szintézisét.

Kérdések

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 neokortexben 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?

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 nagyagyi 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?

3. Szeretném végül megkérdezni a Jelölt véleményét a felszálló transzmitter rendszereknek az epilepsziás tevékenységben betöltött esetleges szerepével kapcsolatban. Ezek a rendszerek alapvetően módosítják a hippokampális 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 dolgozat lényeges, új megállapításai

1. A Jelölt állatmodellekben megállapította, hogy a hippokampuszban fiziológiásan kialakuló „sharp wave-ripple komplexek” (SPW) létrejöttéhez elengedhetetlen mind a gátló, mind a serkentő sejtek működése, de az eseményeket a gátló sejtek vezérlik. Ezzel szemben, az epilepsziás interiktális tüskéket a CA3 régió börsztölő piramisneuronjai kezdik, bevonva a környező sejteket és a többi hippokampális régió neuronjait.

2. Temporális epilepsziában szenvedő betegek hippokampális szeleteiben a Jelölt kimutatta, hogy a subiculumban található olyan piramisneuronok, amelyekből hiányzik a kloridion gradienst szabályozó egyik transzporter (KCC2), így megnő a sejtben belüli klorid koncentráció. A gátló GABA transzmitter az A típusú receptorához kapcsolódva így ezekben a sejtben klorid kilépést és hipopolarizációt okoz. Ez hozzájárulhat az interiktális tüskék kialakulásához.

3. A subiculummal ellentétben a CA2 régióban a sejtek többsége serkentő választ mutat a tüskék során. Az előzetes feltételezések ellenére azonban a periszomatikus gátlás nem csökken, bár az ezt adó parvalbumin-tartalmú kosár- és axo-axonikus sejtek száma kevesebb lesz. Ugyanakkor viszont az axonjaik sarjadzanak, és több szinapszist adnak a szemcsesejtekre.

4. Nagy jelentőséggel bír, hogy míg a korábbi, emberi mintákon végzett in vitro megfigyelések többségében csak epilepsziás betegek agyszeleteit vizsgálták, a Jelölt nem epilepsziás betegek agyszeleteit hasonlította az epilepsziásokéhoz. Kimutatta, hogy a nem epilepsziás betegek mintáiban is jelentkezik szinkron populációs aktivitás, ami azonban számos tekintetben erősen különbözik az epilepsziások interiktális tüskéitől.

Összefoglalva, a Jelölt dolgozata nagyon értékes, sokféle preparátumot és megközelítési módszert tartalmazó kísérleti anyagot ismertet. A magas tudományos szintet a kísérletek eredményeiből készült, nívós folyóiratokban megjelent cikkek is jelzik. A felsorolt kritikai megjegyzések és tisztázásra váró pontok nagyrészt a dolgozat kissé szokatlan formájára vezethetők vissza. Feltétlenül javaslom a dolgozat nyilvános vitára bocsátását.

Budapest, 2022. október 23.

Dr. Détári László
emeritus professzor, az MTA doktora