

Opponensi vélemény

Az MTA Doktori Tanácsa DT.58.027/21/08 számú felkérésére az alábbiakban fejtem ki opponensi véleményemet Dr. Wittner Lucia: „**Fiziológiás és epilepsziás szinkronizációs folyamatok vizsgálata humán és rágcsáló agykéregben**” című doktori munkájáról.

Az epilepszia olyan neurológiai betegségek gyűjtőneve, melynek során az agyi elektromos aktivitás átmeneti zavara (hiperexcitabilitás és rohamok) figyelhető meg. Előfordulását tekintve a lakosság nagyjából 1-1,5%-a érintett világszerte. A betegség kezelésére számos, különböző hatásmechanizmusú, különböző célmolekulán ható gyógyszert kifejlesztettek, melyek végső soron a túlzott neuronális aktivitás csökkentését célozzák, ugyanakkor gyakran kellemetlen mellékhatásokkal járnak. Az esetek egyharmada azonban terápia-rezisztensnek bizonyul.

A téma tanulmányozása elméleti szempontból is izgalmas, különösen, ha összehasonlítjuk az epilepszia-szerű szinkronizációs aktivitásokat a fiziológiás szinkron tevékenységekkel. Ugyanakkor, mint fentebb említettem, a témának jelentős orvosi, társadalmi, gazdasági vonatkozása is van.

Ezen a területen végzi kutatásait Dr. Wittner Lucia, és foglalta össze legfontosabb eredményeit egy akadémiai doktori értekezés formájában.

Először formai szempontból szeretném értékelni az értekezést.

Az értekezés 129 (irodalmi listákkal együtt 146) oldalnyi terjedelmű, hagyományos szerkezetű, ábrákkal (63 db) gazdagon ellátott munka.

Ami rögtön megragadja az olvasót, az az értekezés igényes elkészítése, esztétikus kivitelezése. A mű alapos tanulmányozása során sem csalódik a bíráló; betűhibát, félreütést, vagy stiláris problémát alig találni az értekezésben. Néhány apróság azért előfordul.

Ezek közül példaként felsorolnék párat:

- következetlenség a (ko)transzporter – (ko)transporter írásában pl. 37., 39. o.
- más a betűsorrend az ábrán (c-i) és az ábra szövegében (i-C) (21. ábra)
- felesleges „z” betű („... a gátló idegsejteket” helyett („... az gátló..”) 69. o., 12. sor
- 30. ábra E: a skála 10 μ m, az ábra szövegében 50 μ m
- 30. ábra G: az ábra szövegében ugyan szerepel, hogy mi látható a G panelben, de hiányzik a vonatkozó szövegrész elől a „G” betű.
- félreütés miatt „és” helyett „ér”, 56. ábra szövege
- betűkimaradás: „egymást” helyett „egymst” 57. ábra szövege
- betűcsere miatt „emeli meg” helyett „elemi meg”, 60. ábra szövege

Egyéb, többségében még mindig formai szempontú észrevételek:

- Dicséretes, hogy a magyar nyelvű értekezés ábráinak jelentős része is magyar nyelvű, ugyanakkor vannak ábrák (pl. a 21. ábra), mely az eredeti közleményből változtatás nélkül, angol nyelvű rövidítésekkel lett átvéve.
- Az ábra magyarázatok nem mindig elég részletesek, pl. 28. ábra B paneljében lévő b ábra részen lévő nyílhegyek, továbbá a c ábra részen lévő 7th, 8th stb. rövidítések magyarázata hiányzik. Természetesen tudható, hogy pl. az utóbbi az egyes elágazódások utáni axon szakaszokat jelölik, de *ha egy ábrán jelölések vannak, azokra illik kitérni az ábra szövegében.*

- 41. ábra C: a szinaptikus borítottságot mutatja. Hiányzik az elemszám (N)!
- A 101. oldalon (11. sor) szerintem hibás hivatkozás történik az 54. ábrára. Az 54. ábra nem erről szól! A helyes hivatkozás az 52. D ábra lenne.

A Jelölt a *Céltűzések* fejezetben (35-38. old) 8 csokorba szedte a vizsgált tudományos kérdéseket. Minden egyes kérdéscsoporthoz megadta azt, ill. azokat az eredeti közleményeket, melyekben az adott problémát annak idején vizsgálták. Ha az eredeti közleményeket megnézzük, és összevetjük a jelen értekezéssel, megállapíthatjuk, hogy vannak ábrák, melyek egy az egyben kerültek át az értekezésbe (pl. az értekezés 13. ábrája megegyezik a hivatkozott közleményben a Fig. 1-el), de az ábrák többsége „átszabva” került be a dolgozatba (pl. az értekezés 14. ábrája - egy nagyon komplex ábra, mely az eredeti közleményben két ábrára bontott (a Fig. 2-re, ami ráadásul ott ki van egészítve, és a Fig. 3-ra). Valószínűleg a Jelölt az értekezésben rövidíteni akarta eredményeinek ismertetését, ezért összevonásokat eszközölt, ami azt eredményezte, hogy a mű helyenként nagyon tömény lett. Az eredeti közlemények sokszor könnyebben követhetőek (gyakran hosszabbak az ábraszövegek is). Több alkalommal is volt ilyen érzésem.

A fenti kritikai észrevételek ellenére is megállapítható, hogy az értekezés komoly tudományos eredményeknek egy jól sikerült sűrítvénye, mely a maga töménységében is jól olvasható, –többségében- követhető és érthető. A megértést nagyban segíti a kellő számú és részletességű ábra anyag.

Tartalmi szempontú észrevételek, kérdések az általam elfogadott új tudományos eredményekkel kapcsolatban.

Alapcéltűzés az epilepsziás és nem epilepsziás szinkron események közti hasonlóságok és különbözőségek feltárása volt, állatmodelleket és humán agyszeleteket vizsgálva.

- 1) A fiziológiás éles hullám keletkezésével kapcsolatban ***megállapították*** - többek között-, ***hogy a periszomatikus gátló sejteknek kiemelten fontos szerepe van az éles hullám-ripple-k (SPW) kialakulásában***, vezérlésében. Kétféle SPW-t karakterizáltak (T1 és T2). Mindkettő generálódásában szerepe van még a piramis sejteknek, valamint további interneuronoknak is.

Kérdés: Milyen további kísérletekkel lehetne tisztázni a többi különféle gátlósejt esetlegesen differenciált szerepét a T1 és a T2 SPW kialakulásában?

- 2) Az epilepsziához köthető szinkron események az un. interiktális tüskék. ***Megállapították, hogy az interiktális tüskéket a CA3a régió piramis sejtjei kezdik***, és onnan tevődnek át a CA2-be és a CA3b-be.

A 17. ábra D része olyan helyzetet mutat be, ahol mini szeleteket készítettek, azaz, szétválasztották a CA3a-t és a CA3b-t. Ekkor a két régióban egymástól függetlenül keletkeztek interiktális tüskék, melyek előfordulási valószínűsége különbözött. A CA3b aktivitása sokkal alacsonyabb volt.

Kérdések: **1:** Minél távolabb kerülünk a CA3a-tól annál kisebb lesz az előfordulási valószínűsége ezeknek a tüskéknek? Ha nem szakítjuk meg a kapcsolatokat a CA3a és a CA3b között, akkor teljesen szinkron az aktivitásuk (17. ábra A). **2:** Ezek szerint a CA3a, mint „elsődleges vezérlő központ” dominálja a körülötte lévő régiókat? **3:** A CA1-ben egyáltalán nem keletkezik interiktális tüske? **4:** Kijelenthető, hogy a CA3a finomszerkezeti jellegzetessége (ti. a piramis

sejtekre érkező magasabb serkentő bemenet szám) meghatározó jelentőségű a fokozott szinkron aktivitásban?

- 3) Az epilepsziás rohamok keletkezésének tanulmányozása során génexpressziós, elektrofiziológiai és anatómiai kísérleteket végeztek. Genetikai profil vizsgálattal 1526 transzkript expressziójának változását figyelték meg kainát egyik oldali dorsalis hippocampusba történő beadása után, különböző időkben. Megállapították, hogy a génaktivációs változások a korai (status epilepticus) idejére és a latens szakaszhoz köthetők, míg a gyulladáshoz főként a látens szakaszt jellemzik. Érdekesnek találom, hogy 6 órával a beadás után, vagyis kb. a status epilepticus kialakulásának az idejére, éppen a contralaterális ventrális hippocampusban upregulálódott a legtöbb gén expressziója.

Kérdés: Mi lehet ennek a magyarázata? Azaz, mi lehet az oka annak, hogy a legkorábbi vizsgálat során tapasztalt génexpresszió upregulálódás a legnagyobb mértékben éppen a contralaterális-ventrális régióban történik?

- 4) A hippocampalis szinkron aktivitások anatómiai hátterét vizsgálva arra a **megállapításra jutottak, hogy a két párhuzamos rendszer (a gyrus dentatus : GD és a CA1) közé ékelődő CA3-as régió, a maga sajátos kapcsolatrendszerével lehet az anatómiai alapja az SPW-k keletkezésének.**

Kimutatták azt is, hogy a sejtpusztulás nem feltétele az epilepsziás aktivitás kialakulásának.

Megjegyzés: Az értekezésnek ebben a fejezetében két olyan állítást találok, melyek önmagukban is és együtt is helytállóak lehetnek, mégis, tartalmuk rejt ellentmondó elemeket. Az egyik állítást a fenti bekezdésben már említettem: „... a hippocampus, és ezen belül is a CA3 régió eme sajátos összeköttetési rendszere lehet az anatómiai alapja a SPW-ek keletkezésének..” Ez a megállapítás –bár azt nem állítja, hogy csak ebben a kapcsolatrendszerben keletkezhetnek SPW-k, annyit mond, hogy ez az összeköttetési rendszer lehet az anatómiai alapja. A másik állítás, - ami, ha nem is mond ellent-, mindenképpen gyengíti az előzőt, az pedig azt mondja, hogy „morfológiailag különböző neuronális hálózatok ugyan olyan szinkron aktivitás létrehozására képesek...” (64. old. 14-15. sor).

- 5) Az emberi hippocampusban megjelenő interiktális aktivitás mechanizmusát vizsgálva **azt találták, hogy a subicularis piramis sejtek kb. 1/5-e GABA-ra depolarizálódnak.** In situ hibridizációs módszerrel pedig **kimutatták, hogy a subiculum piramis sejteinek 20-30%-ban nem fejeződik ki a klorid homeosztázis szempontjából fontos kettes típusú K-Cl kotranszporter (KCC2) mRNS-e.**

- 6) **Kimutatták továbbá, hogy -bár a CA2 régió szintén képes interiktális tuskék generálására-,** itt a subiculummal ellentétben, a kloridion gradiens nem játszik fontos szerepet az interiktális tuskék generálásában. Itt más mechanizmust kellett feltételezni. Azt találták, hogy **itt a serkentő bemenetek száma nő meg, azaz, a gyrus dentatus moharostjai sarjadzanak,** benőnek a CA2 régióba, ahol a piramis sejtekre extra serkenető bemeneteket adnak.

Kérdés: Mi készítheti sarjadzásra a gyrus dentatus moharostjait? Végző soron, mi lehet a CA2 régióbeli interiktális aktivitás kialakulásának eredő oka?

Részletesen vizsgálták a human hippocampusban megjelenő epilepsziás aktivitás anatómiai hátterét is. Itt is gyanúba került a klorid homeosztázis egyensúlyának lehetséges megbillenése, azaz, a KCC2 fehérje. Az állatkísérleti eredményeknek némileg ellentmondott az az eredmény, hogy a KCC2 fehérje mennyisége

megemelkedik epilepsziás betegek hippocampusában a kontrollhoz képest. Ezzel kapcsolatos

Kérdések: A hippocampalis sclerosis mértéke (mHS vs sHS) mennyire áll arányban a betegség súlyosságával, pl. a hiperexcitabilitással, az interictális-jellegű aktivitással? Hogyan kell értelmezni azt a Western blot eredményt, miszerint a KCC2 fehérje mennyisége az mHS esetében nőtt meg szignifikánsan, míg a súlyos szklerotikus esetekben (sHS) nem tért el a kontrolltól (44. ábra B)?

- 7) Nem epilepsziás (pl. tumoros) betegekből származó nagyagykérgi és hippocampalis túlélő szeletekben is megjelennek szinkron események (SPA), melyeket az interictális tüskék in vitro modelljének tekintenek (NoEpi). Ezeket összehasonlították a három epilepsziás csoport (ResEpi: terápiarezisztens; TreatEpi: kezelhető epilepsziás és NoMed: antiepileptikumot nem kapott) szinkron eseményeivel. **Kétféle szinkron tevékenységet tudtak karakterizálni:** a spontán populációs aktivitást (**SPA-t**) és az interiktális-jellegű kisülést (**IID-t**). Az SPA előfordult mind epilepsziás, mind pedig nem epilepsziás csoportokban, míg az IID csak epilepsziás szeletekben. Kimutatták, hogy a glutamaterg és a GABAerg rendszer is szerepet játszik az SPA-k kialakításában. A vizsgálatok egyértelműen mutatták az epilepsziás minták hiperexcitabilitását (pl. az SPA-k magasabb LFP és CSD amplitúdói, melyek az IID-k esetében még magasabbak). **Külön szeretném kiemelni** azt a kísérletsorozatot, melyben az SPA-k kialakulását kombinált elektrofiziológiai és két foton mikroszkópos rendszerrel vizsgálták. *A szakirodalomban először korreláltatták humán neuronokban a szomatikus és dendritikus Ca^{2+} -jeleket sejtestből elvezetett akciós potenciálokkal.*

Az epileptiform aktivitás keletkezési mechanizmusait vizsgálva azt találták, hogy interiktális tüskék spontán módon megjelentek mind a négy betegcsoportban, míg rohamokat csak a ResEpi és a NoEpi csoportokban detektáltak.

Kérdés: Első hallásra ez meglepőnek tűnik -, mármint a NoEpi-ben megjelenő. Mi lehet ennek a magyarázata?

- 8) A *diszinhibíciós modellben indukált tüskéket* (IIS-el jelölt) vizsgálva azt találták, hogy ezek *a kéreg bármelyik rétegéből indulhatnak.*

Kérdések: teljesen véletlenszerű, hogy az IIS-ek a kéreg mely rétegéből indulnak? Nem figyelhető meg semmiféle area-specifitás? Hasonlóképpen, a terjedési sebességük (3 félét írtak le) sem köthető areákhoz?

- 9) A szakirodalomból is ismert, hogy rágsálók diszinhibíciós modelljében (bicuculline-al) a burst-ölő V. rétegbeli piramissejtek indítják az interiktális tüskéket. *Véleményem szerint fontos különbség az a megfigyelésük is, hogy humán (szintén bicuculline-s) neocorticalis szeletekben viszont a gátló interneuronok tüzelése indítja az IIS-eket.*

Epilepszia esetében a legfontosabb kérdések egyike, hogy az iniciálódás után milyen mechanizmussal szinkronizálódnak a neuronok. Ennél a kérdésnél a Jelölt felveti az egyes interneuron csoportokon lévő gap junction kapcsolatok szerepét, és jelzi, hogy ezeket a hipotéziseket a jövőben tesztelni szeretnék.

Nagyon egyet tudnék érteni azzal, ha a Jelölt a rendelkezésére álló, kiemelkedő színvonalú infrastruktúrát, az elérhető metodikai repertoárt és tudását egy időre a gap junctionok lehetséges szerepének vizsgálatára is tudná fókuszálni. 15-20 éve halmozódnak a gap junctionok lehetséges szerepére utaló evidenciák. Úgy gondolom, hogy a téma megérne egy intenzív, ilyen irányba fókuszált kutatást.

Az értekezés nagy pozitívumának tartom a kiemelkedő metodikai színvonal mellett a kísérleti adatok óvatos interpretálását, a mértéktartó következtetés-levonást, és azt, hogy külön felhívja a figyelmet az állatmodellekből nyert adatok óvatos kezelésére, ill. a humánra vonatkozó következtetés-levonások esetleges buktatóira.

A bemutatott eredmények alapján senkiben kétség nem merülhet fel annak tekintetében, hogy Dr. Wittner Lucia nemzetközi mércével mérve is kimagasló tudományos munkát végzett. Szakszerűen, gondosan megtervezett, a legkorszerűbb módszerekkel, széles metodikai repertoárt használó kísérletek során jutott jelentős megállapításokra. Értekezésében több eredeti megállapítást tett, és eredményeit rendszerbe foglalta. Mindehhez szívből gratulálok! Véleményem szerint Dr. Wittner Lucia értekezése, (legfőképpen a bennfoglalt publikációk) messzemenően teljesítik a tudomány doktora cím megszerzésével szemben támasztott követelményeket. Ennélfogva a mű alkalmas a nyilvános vitára. Tisztelettel javaslom a Bíráló Bizottságnak az értekezés elfogadását, és Dr. Wittner Lucia részére az MTA doktora cím odaítélését.

Szeged, 2022. szeptember 09.



Toldi József