



TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT
KOGNITÍV IDEGTUDOMÁNYI ÉS PSZICHOLÓGIAI INTÉZET
INTEGRATÍV IDEGTUDOMÁNYI KUTATÓCSOPORT
1117 BUDAPEST, MAGYAR TUDÓSOK KRT. 2.

LEVÉLCÍM: 1519 BUDAPEST, PF. 286.
TELEFON: +36 1 382 6806
E-MAIL: fiath.richard@ttk.hu
www.ttk.hu

Opponensi vélemény

Fedor Flóra Zsófia

“ Applications of electrocorticography to investigate the pathomechanism of brain disorders”

című doktori értekezéséről

A doktorjelölt három aktuális kutatási téma köré építi fel értekezését, melyek középpontjában egy korszerű elektrofiziológiai mérési technika, az úgynevezett elektrokortikográfiás (ECoG) mérés áll, mellyel az agykéreg elektromos tevékenységét rögzítjük közvetlenül az agykéreg fölé, vagy a kéreg felszínére helyezett elektródokkal. A doktorjelölt ezt a kutatási módszert használja különféle agyi rendellenességekhez vezető folyamatok vizsgálatára, így a bemutatott kutatási témák tudományos és társadalmi szempontból is jelentősek.

Az angol nyelvű dolgozat 101 oldal terjedelmű, 32 ábrát és 337 műből álló irodalomjegyzéket tartalmaz. A disszertáció logikusan felépített, a három kutatási téma bemutatása külön fejezetekbe került, melyeket egy szakmai háttérrel ismertető rész előz meg. Az angol nyelvű szöveg könnyen érthető, viszonylag kevés elírást, nyelvtani hibát tartalmaz. Viszont véleményem szerint érdemes lett volna kissé egységesebbre szerkeszteni a dolgozatot, mivel a három kutatási téma felépítése, bemutatásának részletessége, nyelvezete néhol jelentős különbségeket mutat. Az egyes kutatómunkákat bemutató fejezeteket a kapcsolódó tézispontok bemutatása és saját publikációk felsorolása zárja. A doktorjelölt dolgozatában egyaránt megtalálhatók az egyes témákhoz kapcsolódó tudományos irodalom legfrissebb eredményei, ahogy a témával összefüggő legfontosabb publikációk is, melyekre a dolgozat épül.

A kutatások bemutatását egy viszonylag rövid, 14 oldal hosszúságú, a szakirodalmi háttérrel ismertető fejezet előzi meg, mely többek között az agyi elektromos tevékenység kialakulására, ennek mérési módszereire, valamint a későbbi fejezetekben ismertetett kutatásokban vizsgált agyi rendellenességekre (epilepszia és

skizofrénia) fókuszál. Ebben a bevezető fejezetben azonban főként inkább egy általános és történeti áttekintést olvashatunk a fenti témákban, mintsem a legfrissebb kutatási eredmények és az aktuális nyitott kutatási kérdések bemutatását. Véleményem szerint, mivel az elektrokortikográfia a disszertáció központi témája és mérési módszere, az epilepszia és a skizofrénia áttekintésénél hasznos lett volna a jelenlegi kutatásokban használt főbb vizsgálati módszereket és ezek jelentősebb korlátait is ismertetni, talán még azt is, hogy ezekhez a módszerekhez képest milyen előnnyel járhatnak, mivel adhatnak többet a doktorjelölt kutatása során is alkalmazott ECoG mérések. Esetleg néhány olyan közelmúltban megjelent tanulmány eredményeit is érdemes lett volna itt összefoglalni vagy részletesebben bemutatni, melyekben az ECoG módszert alkalmazták a vizsgálatok során. Az immunohisztokémiai módszert ismertető alfejezetről úgy gondolom, hogy talán kissé kilóg a bevezető többi része közül, mivel nem tartozik közvetlenül az értekezés központi témái közé, csupán egyike az alkalmazott vizsgálati módszereknek.

A továbbiakban röviden ismertetem a doktorjelölt által bemutatott három kutatási téma tartalmát, ezen kutatások jelentőségét, erősségeit, és az esetleges problémásabb pontokat is. Az egyes témákhoz kapcsolódó egyéb megjegyzéseim és kérdéseim a bíráló végén olvashatók, a témák szerint csoportosítva. Itt megjegyezném, hogy a megfogalmazott kérdéseim, észrevételeim és megjegyzéseim, melyek néhol talán kissé túlzottan kritikusnak is tűnhetnek (akár már a mennyiségükből adódóan is), inkább az opponens téma iránti szakmai érdeklődését hivatottak tükrözni, mintsem a dolgozat gyengeségeinek kihangsúlyozását.

A doktori értekezés első része az epilepszia-kutatás területéhez kapcsolódik. A kutatómunka során a doktorjelölt egy szerves vegyület, a 4-aminopyridine (4-AP) különböző koncentrációinak rohamgeneráló hatását vizsgálta egerekben. A 4-AP által kiváltott rohamtevékenységet régóta használják epilepszia modellként patkányokban, azonban a 4-AP által indukált epileptiform aktivitás tulajdonságai egerekben még kevésbé vizsgáltak. A kutatás során a kísérleti állatok koponyájába, vagyis az agykéreg fölé beültetett csavarelektrodok segítségével vizsgálták az agykérgi elektromos tevékenység változását a hasüregbe adagolt 4-AP vegyület hatására. A kísérletsorozat erősségei közé tartozik, hogy a szomatoszenzoros kéregből történő mérések mellett az egerek viselkedésében, mozgásában bekövetkező változásokat is nyomon követték gyorsulásmérők alkalmazásával. A témához kapcsolódó szakirodalmi eredményeket összefoglaló bevezető rész jól elkészített, azonban úgy gondolom, hogy érdemes lett

volna a módszertani (különösen az adatok feldolgozására vonatkozó) részt, valamint az eredményeket bemutató alfejezetet tartalmilag bővebben, részletesebben is kidolgozni. Például több fontos, az adatfeldolgozáshoz kapcsolódó fogalom definícióját sem találtam meg a szövegben, ami körülményessé teszi az eredmények és azok jelentőségének megértését. Az eredmények bemutatásánál segíthette volna azok könnyebb megértését és interpretációját egy, a két koncentrációval kapott eredményeket tartalmazó, összefoglaló táblázat elkészítése is. Ennél a fejezetnél néhány kisebb hiba is becsúszott a szövegbe, melyek tovább nehezítették a gördülékeny olvasást és megértést: például a 27. oldalon egy nagyjából egy bekezdésnyi szöveg két oldallal később megismétlődik (a 29. oldalon), valamint a módszerek leírásánál több olyan alábrára is hivatkozik a szerző, melyek csupán az eredeti, publikált közleményben találhatók meg, az értekezésben viszont nem (például a 25. oldalon hivatkozások vannak a 10. ábra 'C-F' alábráira). Bár jól látható, hogy jelentős különbség van a kétféle 4-AP koncentráció alkalmazása során kapott eredményeket között, azonban az nem derült ki számomra, hogy miért nem végezték el ezen eredmények statisztikai kiértékelését, hiszen egy viszonylag nagy elemszámú mintán végezték el a kísérleteket (9-9 egér). Végezetül, a diszkusszióból kicsit hiányoltam az eredmények korábbi kísérletek, tanulmányok eredményeivel történő összehasonlítását, például érdekes lett volna látni, hogy korábban leírtak-e már hasonló, a rohamok alatti agyi elektromos tevékenységben mért, vagy akár a gyorsulásmérővel mért adatokon látható, spektrális összetevőket, frekvencia-csúcsokat. A fenti hiányosságok ellenére, a kutatás eredményei izgalmasak és úgy vélem a kísérletek folytatásával egy használható és hasznos epilepszia modellt lehet majd kialakítani egerekben.

A doktorjelölt által bemutatott második kutatás témája agykérgi elektromos aktivitás vizsgálata patkány skizofrénia modellben. Ehhez a doktorjelölt egy 32 darab kisméretű elektróddal rendelkező, polimerből készült, hajlékony ECoG tömböt tervezett és készített, melyet krónikusan beültetett patkányokba. A skizofrénia tüneteinek előidézéséhez intraperitoneálisan adagolt ketamint használt. A kutatás során vizuális ingerlés és fejlett adatelemzési módszerek alkalmazásával vizsgálta a különböző agykérgi területek közötti kapcsolódási mintázatok változását. Az ilyen típusú konnektivitási vizsgálatokhoz a fejlesztett sokcsatornás ECoG elektródok ideálisak, hiszen egyszerre több agyterületről tudunk velük információt kinyerni. A bevezető alfejezet itt is alapos, szép munka, bár talán a bevezető végén érdemes lett

volna részletesebben is bemutatni a kutatómunka főbb céljait, valamint, hogy a vizsgálatokhoz miért pont a ketaminra esett a választás. A módszerek és eredmények fejezetek ez esetben is tartalmazznak apróbb hibákat, pontatlanságokat (pl. mondatismétlődések a 40. és 47. oldalakon; hiányzó ábraszöveg a 39. oldalon; nem a megfelelő ábrára történő hivatkozás a 48. oldalon), és néhány alkalmazott adatelemzési módszer leírása is lehetett volna árnyaltabb, részletesebb (pl. forráslokalizáció, koherencia analízis). Az ábrák alapvetően jól szerkesztettek és megfelelően mutatják a lényeges eredményeket, valamint az eredmények szöveges bemutatása is jól követhető. További hiányosságként még ugyanazt emelném ki, mint az előző témánál is: a kapott eredmények részletesebb összevetése korábbi tanulmányok eredményeivel hiányzik (leszámítva két tanulmány rövid megemlítését), valamint csupán a 21. ábrához kapcsolódó ábraszövegben olvashatunk a kapott eredmények statisztikai elemzéséről, összehasonlításáról. Összefoglalásul, úgy gondolom, hogy a vizsgálat eredményei akár új kutatási irányokat is megalapozhatnak a skizofrénia (vagy akár más agyi rendellenesség) mögötti agyi folyamatok jobb megértésére.

A harmadik kutatómunka egy saját fejlesztésű, hőre lágyuló, sokcsatornás tiolén-akrilát alapú ECoG eszköz fejlesztési lépéseit, valamint elektrofiziológiai tesztelését és szövettani vizsgálatait mutatja be. A vizsgálatokhoz a doktorjelölt az eszközt hosszú távra ültette be egerekbe. Az ECoG tömb multimodális kísérletekben is alkalmazható, például fedőlemezt helyezve fölé optikai (két-foton mikroszkópiás) vizsgálatokhoz. A kutatás leírását egy jól összeszedett, színvonalas bevezető nyitja. A kutatás és az eredmények bemutatása részletes és jól követhető, a szöveget látványos, jól szerkesztett ábrák egészítik ki. Építő kritikaként megjegyezném, hogy a statisztikai elemzés során kapott szignifikancia értékek (p érték) ne csupán a fejezet végére, az összefoglaló fejezetbe kerüljenek, hanem elsősorban az eredmények közé. Ennél a kutatásnál különösen érdekes fejlemény, hogy a dura mater eltávolítása a műtét során (vagy a fedőlemez jelenléte) valószínűleg jelentősebb szerepet tölt be az agyszövet krónikus immunválaszában beindításában és fenntartásában, mint maga a hosszú távra beültetett ECoG eszköz.

Végül röviden kitérnék még a tézisfüzetekre is. Sajnos a magyar nyelvű tézisfüzet nagy számú elírást, pontatlanságot, magyartalanságot (főként angol nyelvű fordításból eredő) vagy angol szót tartalmaz, valamint a szövegben több helyen is hiányoznak hivatkozások. Az angol nyelvű tézisfüzetben lényegesen kevesebb a hiba,

azonban egyes részekben jelentős különbségek vannak a magyar és az angol nyelvű téziszfüzet között (pl. az angol nyelvű téziszfüzetben hattal több referencia található).

Mindent összevetve Fedor Flóra Zsófia doktori értekezését jó és értékes munkának tartom, a dolgozat új tudományos eredményeket is tartalmaz. A tézisekben összefoglalt eredményeket új eredményeknek fogadom el. A doktori kutatómunkája során korszerű módszereket alkalmazva új, vagy legalábbis jelentősen továbbfejlesztett kutatási eszközöket is létrehozott, többek között a patológiás idegi folyamatok vizsgálatára. A doktorjelölt doktori értekezéséhez kapcsolódó publikációs teljesítménye megfelelő: három elsőszerzős tanulmányt publikált, melyek a Scimago Journal Rank szerinti Q1-Q3 kategóriába tartozó, lektorált, angol nyelvű tudományos folyóiratokban jelentek meg. Ezek között van kimondottan jó impakt faktorral rendelkező folyóirat is, például az Advanced Materials Technologies 7 feletti impakt faktorral, melyben a hőre lágyuló ECoG eszközhöz kapcsolódó eredményeket publikálta, mely közleményt a közzététel óta már idéztek is más kutatók. A jelölt megfelelően bemutatta, hogy képes önálló kutatásra, magas szintű mérnöki tudással rendelkezik, továbbá a publikációs követelményeket is megfelelően teljesítette. A fentiek alapján a doktori értekezést elfogadásra javaslom, sikeres védés esetén pedig a PhD fokozat odaítélését javaslom.

.....

Dr. Fiáth Richárd

Budapest, 2021. január 24.

tudományos munkatárs
Természettudományi Kutatóközpont
Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet

„Characterization of 4-AP induced epilepsy in B6 mice using stainless steel electrodes” fejezethez kapcsolódó kérdéseim és megjegyzéseim:

- A fejezet módszertani részében több fontos fogalom definíciója, ismertetése is hiányzik, például mit takar a „spiking activity enrichment” kifejezés (25. oldal)?
- Kevés információ olvasható a módszertani fejezetben arról is, hogy hogyan vizsgálták az állatok viselkedését/mozgását a gyorsulásmérő segítségével. Hogyan definiálta az ECoG jelek mellett vizsgált motoros aktivitást („locomotor activity”

26. oldal)? Hogyan határozta meg a motoros aktivitás alapján a rohamok kezdetét? Hogyan különböztette meg a fizioológias mozgási mintázatot a 4-AP által kiváltott rohamoktól?

- Mik voltak az ECoG méréshez beültetett csavarelektrodok anterior-posterior koordinátái (23. oldal)? A 9. ábra alapján úgy tűnik, hogy a caudalisan elhelyezkedő csavar már nem a célterület (szomatoszenzoros kéreg) fölött található.
- Az értekezés 24. oldalán az alábbi olvasható: „The behaviour of the animals was recorded with a camera”. A kamera által rögzített viselkedési információkat felhasználta valahol a vizsgálat során?
- Látszólag a kontroll időtartományban is találhatóak epileptiform tüskék (29. oldal, ~5 tüske a kontroll időszak alatt). Ezek valós tüskék voltak vagy az adatok feldolgozásához használt módszer értelmezte a fizioológias agytevékenységet néhány esetben epileptiform aktivitásnak? Mi a mértékegysége a mért értékeknek (pl. darab/perc)?
- A 13. ábra 'A' és 'B' alábráin a koncentrációk feliratai (4 mg/kg vs. 10 mg/kg) úgy tűnik, hogy fel vannak cserélve, mivel a szövegben olvasható eredmények (29. oldal) pont ellentétesek az ábrán látható értékekkel. A 'C' alábrához pedig, amely statisztikai eredményeket is tartalmaz, nem találtam leírást és hivatkozást a szövegben.
- A 29. oldalon az alábbi olvasható: „After data normalization with control spike number, the increase in spiking activity was 222% larger in case of the higher dose”. Viszont lentebb, a 33. oldalon a doktorjelölt a következőt írja: „evoked spike number count showed that spiking activity was fairly the same in case of the two doses”. Kérném, hogy tisztázza a fenti ellentmondást.

„Investigation of schizophrenia in rat models using a flexible, polyimide based μ ECoG array” fejezethez kapcsolódó kérdéseim és megjegyzéseim:

- A vizsgált agykérgi területeket és azok megcélzását vagy utólagos azonosítását érdemes lett volna expliciten is bemutatni a módszertani fejezetben.
- A 16. ábrához (39. oldal) tartozó ábraszövegben a 'B-F' alábrák nem kerültek bemutatásra.

- A kamerával és gyorsulásmérővel mért adatokat felhasználták valahol a vizsgálatok során („The behaviour of the animals was recorded with a camera and their movements were monitored with a 3D accelerometer”; 40. oldal)?
- A 41. oldalon az alábbi olvasható: „Ketamine (Calypsol, in 15 mg/kg or 50 mg/kg dose) was injected intraperitoneally” A fejezet további részei és az eredmények bemutatása alapján viszont számomra úgy tűnik, hogy csak az alacsonyabb ketamin koncentrációt használta a vizsgálatok során. A magasabb dózissal is végzett vizsgálatokat?
- A 40. oldalon, a 3.2.4 alfejezetben az alábbi olvasható: „The method was validated on simulated data.” Milyen módszerről van itt szó? A később bemutatott koherencia klaszterezésről talán?
- Számomra úgy tűnik, hogy a 17. ábra 'i' alábrájához tartozó ábraszöveg nem az ábrán látottakat írja le. Az egyes színek mely frekvenciákat reprezentálják a 17. ábrán?
- A kCSD módszer valamilyen szinten működik hiányzó és rossz csatornák esetén is. Átlagosan hány csatorna volt rossz a mérések során és ezek száma okozott-e problémát a kCSD térkép létrehozása során?
- A módszertani fejezetben bemutatott BrainAreaR szoftvert a doktorjelölt fejlesztette vagy ez egy szabadon elérhető szoftver?
- A 18. ábra alatti ábraszöveg lényegében egy módszertani leírás, ezt érdemes lett volna inkább átemelni a szöveges leírásba.
- A 47. oldalon az alábbi olvasható: „the cortical distribution showed a rather fragmented, mosaic-like picture which coincides with the behavioural changes and the literature as the rat was visibly disoriented.” A dezorientáltságot hogyan mérte/definiálta?
- A 48. oldalon a következőmondat szerepel: „The pattern of high coherence cortical sites corresponds to the anatomically identified functional areas of the rat brain.” A leírásban olvasható eredmények melyik ábrán láthatók?
- A koherencia klaszterezés eredménye hol kerül leírásra, bemutatásra? Például a diszkusszió végén, az 52. oldalon szereplő eredmény („Smaller number of spatially more extent clusters in optimal coherence clustering, as well as higher cross correlations showed higher and wider synchronization in the cortex, resulted by ketamine administration”) melyik ábrá(ko)n került(ek) bemutatásra?

„Characterization of a thiolene-acrylate based μ ECoG array” fejezethez kapcsolódó kérdéseim és megjegyzéseim:

- Érdekes lenne megvizsgálni és összehasonlítani a kapott eredményeket azzal az esettel is, ha fedőlemez nélkül ültetünk be hosszú távra egy ilyen hőre lágyuló eszközt. Mit gondol erről, milyen különbségek/hasonlóságok várhatóak a kapott eredményekhez képest?
- Az agyszövet és a fedőlemez közé került valamilyen anyag (pl. szilikon), vagy közvetlenül az agyfelszínre/ECoG eszközre helyezték a fedőlemezt?
- A vizsgálatokhoz használt mintaszám ($n = 3$ egér) számomra kissé alacsonynak tűnik a korábbi kutatásokban használt állatszámokhoz képest (5-20 állat). Volt valami oka annak, hogy ilyen alacsony számú állaton végezte a kísérleteket?
- A jel-zaj viszony kiszámításához a jelet előzetesen megsűrte egy 200 Hz-es aluláteresztő szűrővel. Ezzel azonban az egyik legjelentősebb zajtípus, az 50 Hz-es hálózati zaj nem kerül eltávolításra, és amennyiben az jelentős mértékű, erőteljesen befolyásolhatja a mért jelek minőségét. Viszont ennek a zajnak a hatása az értekezésben számolt jel-zaj viszonyban nem fog látszódni. Vizsgálta-e esetleg az 50 Hz-es zaj mértékét a jeleken?
- Vizsgálta-e esetleg, hogy a kísérletek végeztével az agy felszínéről eltávolított ECoG eszközön maradt-e agyszövet az eltávolítás során (pl. a 29. ábra 'D' alábráján az agyfelszínen látható gliális réteg egy része), és ha igen, mit gondol, befolyásolhatta-e ez a szövettani vizsgálatok eredményeit?
- A 62. oldalon a következő olvasható: „the position of the device was determined on the surface of the cortex manually using Case Viewer (3DHISTECH)” Kérem, hogy ismertesse bővebben, hogy ez hogyan történt.
- A 65. oldalon az alábbi írja: „Functional electrode yield decreased to 75% after implantation.” Mit gondol, mi lehet a fő okozója ennek a jelentős csökkenésnek a működő elektródok számában?
- A DAPI vizsgálatok esetén a szövegben leírtak alapján sejtszámolás is történt (62. oldal). Viszont nem találtam olyan ábrát, amin ennek a sejtszámolásnak az eredménye lenne látható (a 29. és 30. ábrákon intenzitásértékek szerepelnek az y-tengelyen). Kérem, hogy mutassa be a sejtszámolás eredményeit.
- A 31. és 32. ábrák miért a diszkusszió fejezetben szerepelnek? A 32. ábra a szövegben sem kerül bemutatásra (legalábbis hivatkozást nem találtam rá).