Opponenesi vélemény dr Lazáry Judit " Az endokannabinoid rendszer szerepe a pszichés zavarokban: molekuláris biológiai és klinikai vizsgálatok" című MTA doktori értekezéséhez

1. A dolgozat időszerűsége

Sokan mondják, hogy az agykutatás évszázadában élünk. Az agy működésének megértéséhez a molekuláris folyamatok felderítésén keresztül vezet az út. A pszichiátriai betegségek (például stresszhez köthető depresszió, kannabisz-indukálta skizofrénia) társadalmi jelentősége egyre növekszik. A diagnózisuk még ma is klinikai tüneteken alapul, ezért a biomarker kutatás üdvözlendő téma. A kannabinoid rendszerrel való kapcsolat mélyebb felderítése is – a számos ellentmondó adat tükrében – fontos új információkhoz vezethet. Azaz a dolgozat jelentős és időszerű témával foglalkozik.

2. A dolgozat szerkezete

Az értekezés alapját idegennyelvű folyóiratokban közölt 8 első és 1 társszerzős, valamint magyar nyelvű 3 első és 1 társszerzős cikk képezi, melyek alapján a szerző 8 új megállapítást tett. A jelölt sikeresen egységes keretbe foglalta (a kannabinoidok mentén) a kissé szerteágató munkáját.

A dolgozat a formai követelményeknek megfelel, kellő tagoltságú. A 24 ábra jól szerkesztett, különösen dícséretes a magyar nyelv használata az összefoglaló ábrákon, illetve a megbeszélés részben az eredmények egy ábrába történő összefoglalására törekvés (más kérdés, hogy az ábrákon ábrázoltak jó része inkább spekuláció, nem konkrét méréseken alapul, egy lehetséges útvonalat mutat be). Jó lett volna, ha az ereményeket bemutató ábrák is magyarosítva lettek volna. Valamint több és informatívabb, a szöveghez jobban illeszkedő illusztrációnak jobban örültem volna a bevezetésben is (pl. Az 1-es ábraként hasznosabb lett volna a kannabinoidok szerkezetének bemutatása helyett egy, az egész kannaboniod rendszert bemutató összefoglaló ábra (lásd az említett receptor, ligand, transzporter, enzim egység)). A sok táblázat viszont nem tette egyszerűbbé a megértést, pláne a sötétszürke háttéren fekete fejléc (lásd pl 60.o. 24. táblázat). A kétoldalas rövidítés jegyzék is utal a téma összetettségére. Megjegyezném azonban, hogy a rövidítés jegyzék mellett az első megjelenéskor szokás a rövidítéseket bevezetni, ami nagyon sokszor nem történt meg, illetve sok olyan rövidítés került bevezetésre, amit később nem használt a jelölt és a bevezetett rövidítéseket se alkalmazta mindig konzekvensen (lásd 6. pont). A számos elírás, érthetetlen mondatszerkezet (lásd 6. pont) összességében arra utal, hogy a jelölt nem fordított kellő gondot a dolgozat kivitelezésére.

3. A szakirodalom feldolgozottsága

A szakirodalom taglalása néha túlságosan részletekbe menő (pl 1.2 a CB1 jelátvitelnél az aresztin került említésre, holott erről később szó sincs; stressz bevezetése, holott ez se fő kérdés a későbbiekben), néhol viszont hiányos (pl. a kannabisz rendszer olyan génjei, amik az eredményeknél említésre kerülnek; antipszichotikumok: ezek bevezetése nélkül az eredmények résznél érthetetlen, mi lehet a különbség az egyes alkalmazott terápiák közt; a DLPFC és depresszió összefüggése, miért merült fel, hogy itt stimuláljanak). Jó lett volna pl, ha a KEGG adatbázisról is a bevezetőben és nem a módszereknél esik szó; valamint a rumináció is a módszereknél jelent meg először, így jelentősége teljesen homályos maradt (pedig az egész 4.1.5.-os eredmények rész erről szól). Máshol ugyan a szakirodalmat kellő részletességgel idézi a jelölt, de az irodalmi hivatkozások összedolgozottsága lehetett volna sokkal teljesebb. Jelen formában sokszor csak egymás után helyezett külön állításokról beszélhetünk. pl "Nakazi és mtsai (2000) adatai azt mutatták, hogy a CB1R aktivációja gátolja a szerotonin (5-HT) felszabadulását egér agyban (Nakazi *et al.*, 2000)." majd egy mondat kihagyásával "Mato és mtsai CB1 knockout egereket vizsgálva azt találták, hogy a CB1R-ok fontos szerepet játszanak a szerotonerg rendszer szabályozásában (Mato *et al.*, 2007).", ahol az utóbbi mondat végén

történt egy általános megfogalmazás a eCB és 5-HT rendszer kapcsolatáról (szerencsésebb lett volna ezzel felvezetni a témát), és ez a gondolat még további mondatokban is megismétlésre került. A semmitmondó állítások pl "…szerepét a …-ban szintén vizsgálják" helyett jobb lett volna konkrétumok megfogalmazása. Összességében a szakirodalom nagyrésze kellő mélységben került áttekintésre, de a feldolgozás félúton elakadt. Valamint sok területről nem a megfelelő helyen (pl módszereknél) és mélységben történt értekezés (pl. kannabinoid rendszer génjei, antipszichotikumok).

4. A vizsgálati módszerek

A dolgozatban nagyszámú humán minta került feldolgozásra többféle paradigmában. Ekkora elemszámú vizsgálatok elvégzése önmagában embertpróbáló feladat és kétségtelen, hogy a humán vizsgálatokból lehet a legtöbb, a gyógyászatban hasznosítható következtetést levonni. A klinikai tesztek rendkívül széles skálájával ismerkedhettünk meg, melyek jórésze önkitöltős teszt, de több is a klinikus által kivitelezett adatgyűjtésből állt. A bemutatott anyag egy részében perifériás vérminták genetikai feldolgozására került sor igen alapos statisztikai módszerrel, mely nagyon bonyolult összefüggésekre világított rá. A Budapest-i és Manhattan-i minták összehasonlítása ugyanakkor rámutatott a módszer egyik legfőbb hátrányára, a gyenge reprodukálhatóságra. (Erről a limitációról nem történt említés a megbeszélésben.) A kannabisz-indukálta skizofrénia megjelenéséről egy nagyrészt leíró vizsgálat született, míg a transzkraniális mágneses stimuláció kannabisz rendszerrel való összefüggése igazán áttörő vizsgálat. Itt a klinikai intervenció és vizsgálatok a laboratóriumi anyagméréssel ötvöződtek. Azaz az alkalmazott módszerekben jól ötvöződtek a hagyományos klinikai megfigyelések a modern beavatkozásokkal, genetikai és laboratóriumi vizsgálatokkal.

5. A dolgozat tudományos értéke

A szerző publikációi és az akadémiai doktori értekezés alapján dr Lazáry Judit munkásságának új eredményeiből a következőket emelném ki:

1. Humán mintákon genetikai szintű bizonyíték született arról, hogy a kannabisz rendszer (specifikusan a CB1R promoter-polimorfizmus) hatékonyan tarthatja egyensúlyban a szerotonerg rendszerünket, hozzájárulva ezáltal a szorongásos kórképek ritkább előfordulásához.
2. A FAAH enzim és CBR2 gén polimorfizmusainak vizsgálatai (a 75.o.-on említett CB1R ezen irányú vizsgálata az akadémiai doktori dolgozatnak nem képezte tárgyát) igazolták, hogy a kannabisz rendszer működése a gyerekkori traumákra való érzékenységet alapvetően meghatározza, azaz befolyásolja a felnőttkori szorongást és depressziót kiváltó hatásukat. A genetikailag determinált FAAH aktivitás meghatározása terápiás alcsoportok kialakítását teszi lehetővé a jövőben (pl. genetikai kontraindikáció bevezetése egyes szereknél), mely nemcsak a személyre szabott orvoslás szempontjából fontos, de akár tragédiákat is megelőzhet (lásd FAAH inhibitorok okozta halál).
3. Egy további, multicentrikus humán vizsgálat egy feszültségfüggő kálcium csatorna génvariánsának (SNP) gyermekkori traumára érzékenyítő hatását találta, mely fokozta a traumán átesettekben a felnőttkori depresszió előfordulását. Ebben a folyamatban a kannabinoid rendszer érintettsége csak spekulatív, további bizonyítást igényel (pláne mert a vizsgálat a korábbi kannabinoid targetek (CB1R, CB2R, FAAH) vonatkozásában nem erősítette meg az összefüggéseket). (A csak izoláltan, az egyik populációban kimutatott összefüggések általánosítását is kerülném, ezek is további megerősítésre szorulnak).

4. A bemutatott adatok alapján megerősítést nyert, hogy skizofréniásokban a kannabisz használat - valószínűleg akut pszichótikus epizód indukálása révén- korábbi kórházi ellátáshoz vezet, ugyanakkor a tünetek lefolyása enyhébb és gyorsabb, ami - részben - megerősítik a kannabisznak, mint öngyógyító eszköznek a szerepét. Ugyanakkor az ok-okozati összefüggések feltárása további vizsgálatokat igényel.
5. Humán vizsgálatok alapján a rTMS antidepresszáns hatásában a perifériás 2-AG szint emelkedése (dózisfüggő módon) szerepet játszhat, feltételezhetően a HHM tengely befolyásolása révén. További átgondolást igényel az alkalmazott eltérő bilaterális protokoll lehetséges hatásmechanizmusa.

6. Formai kritika

A célkitűzés megfogalmazása túl részletes (pl. 24-25. pontjai egyszerűen összevonhatók lettek volna), ami inkább nehezíti, mint egyszerűsíti a megértést.
Sajnos sok elírás maradt a szövegben (ami a szövegszerkesztők helyesírásellenőrző funkciója mellett nagy figyelmetlenségnek tűnik). Alább néhány példát mutatok az értelmetlen mondatokra, kifejezésekre, pontatlan írásra, melyek jelentősen csökkentették a dolgozat élvezhetőségét.
Nem egységes írásmód jelent meg a dolgozatban. Pl hippokampusz, de raphe; "hyperaktivált immunrendszer és csökkent hippokampális volumen". Sokszor a túlmagyarosítás vicces formákhoz vezetett pl excitábilitás (ha már magyar verzió, akkor ingerelhetőséget kellett volna írni).
A táblázatokban szerepel, hogy átlag ± SD értékek kerültek megadásra, de az ábrákon nem. Ezt jó lett volna a statisztika leírásánál tisztázni.
6. o. "bizarrnak ható utat jár be" múlt idő
8.o. "fatty acid amide hydrolase, FAAH" rövidítés kétszer megadva; GABA rövidítés nincs bevezetve; NAE bevezetése felesleges, többet nem fordul elő, említése is zavaró
9.o. "valamint metabolitot" milyen metabolitot???; lignadjai; addikcíós; koretxben; cAMP magyarázata hiányzik
10.o. "vizsgálják" helyesebb lenne múlt idő; recptorokhoz; HPA első megjelenés, mégsincs kifejtve a jelentés (egyébként is HHM lenne a magyar rövidítés☺); "Akut stressz hatás esetén első lépéseként"; "közrejátszik a … koncentrációhoz"
1. táblázat: Aktvál
11. o. bizonytíották; fMRI nem került bevezetésre a rövidítés
12. o. szignfikáns; SNP jelentése; endokannabnoid; THC magyarázat
14.o. BDNF jelentése; környezetei; "akiknél gyermekkori trauma szerepelt az anamnézisében"; 5-HTTLPR jelentése
15.o. depesszió
2. ábra Az ábra nem túl informatív, a címe teljesen érthetetlen
16.o. "Hill és mtsai MDD-ben szenvedő nők"; szignfikánsan; rTMS magyarázva a 17. oldal közepén, miután már sokszor előfordult (itt egyébként is derült égből villámcsapásként jelenik meg); triciklikis; célszerű lett volna az "új elemet" a régiek után bemutatni.
17.o. VNS, DBS: teljesen felesleges olyan rövidítés bevezetése, amit sehol nincs alkalmazva; ugyanakkor a korábban bevezetett MDD rövidítés nem került alkalmazásra (lásd "major depresszióban" a 26.o.-on is).
18.o. "0.4 msec" és máshol is: tizedesVESSZŐ; ACC, mOFC: magyarázat?; "rTMS hatására növekszik a BDNF expresszió ": hol?
19.o. "inverzív agonistája"; ECCMDA jelentése
21.o. kannbinoidokat; endokannbinoid
23.o. vizgsálatok; gyremekkori trauma; pontszém

24.o. “a klinikai változását”, számos, magyarázat nélküli rövidítés; 23. pont végére nem kell kérdőjel; vizit$_1$ rövidítést vezetett be a jelölt, de V1-et alkalmazott a továbbiakban
26.o. “1200 személyből áll“: múlt idő kellett volna
27.o. antidperesszívumot; “szintén önkitöltős“: mihez képest szintén?; “Állapto-Vonás szorongás”???
28.o. “az állapot szorongás (STAI-S) és a vonás szorongás” helyett javasolnám a “szorongásos állapot és a szorongásos jellemvonás” kifejezések használatát; “CHA-t csoportosítottuk“: szerintem az eredeti számokkal is jól lehetett volna interakciót vizsgálni; “Brooding, mind a Reflection“ célszerű lett volna magyar kifejezés megadása is.
31.o. vizgsálatára; elvégeztek
34.o. egy rövidítésjegyzés célszerű lett volna…
35.o. alkalamztunk
36.o. endokannabnioidok; endokkannabinoid; -80 C: kimaradt a °
37.o. “amikor a 0,05 és a tesztek számának hányadosánál kisebb érték szerepelt” ?; “esélyhányadost (odds ratio, OR) logisztikus regressziós próbával végeztük.“; 3.7.3. Itt szerintem egy mixed ANOVA is jól elvégezhető lett volna, de legalábbis valami ismételt méréses startisztika, hiszen az ugyanazon emberen többször mért értékek nem függetlenek egymástól.
39.o. genereálását
43.o. emelekdésével
44.o. “A harmadik lépésben“ új bekezdésbe kellett volna…
45.o. “A legalacsonyabb pontszámok… volt látható”
46.o. Itt CHA alapján két csoport van, holott korábban 3 csoport lett definiálva… lásd 28.o.
48.o. BP nincs bevezetve és nem szerepel a rövidítésjegyzékben sem; MN nem szerepel a rövidítésjegyzékben; 11. ábra: mi a kék és piros színek jelentősége?; szinifikancia; 11-12. ábra címe: a lista után kéne kettőspont, mert így érthetetlen
51.o. szinifikancia; “bizonyult…SNP-k“
53.o. elemztük; RRS kála;
Nem teljesen világos, miért jelent meg a 19. táblázatban a Würtzburg minta (praktikusan demográfiai adatokkal), mikor hiányzott a további összehasonlításból (lásd 20. táblázat, 13. ábra).
54.o. elsozlás; potentciális; “CREB1 génben”: hogy jön ez ide és milyen kapcsolatban van az előbbiekkel?
55.o. A 4.2. cím (Klinikai vizsgálatok) nem túl találó, hiszen a 4.1.-es pont (formai eltérés!) sem pl állatkísérleteket, hanem betegekből gyűjtött minták és klinikai megfigyelések eredményeit taglalta.; szignifkáns
57.o. “értékei…nem különbözött“; “Cnbs0 csoportba tartozók szignifikánsan magasabb dózisban kapták” célszerűbb lett volna azt kiemelni, hogy a kannabiszosok alacsonyabb dózisban kapták a kontrollokhoz képest. 22. táblázat, hiányzik annak említése, hogy a p-érték a kontroll csoporthoz képesti eltérést jelenti (az egész táblázat csak a kannabiszosokról szól).
“(*p*=0,020; 22. táblázat).“: téves hivatkozás, itt a 23.táblázatra kellett volna utalni
59.o. “pontszámai… csökkent“; “pontszámai…mutatott”
61.o. 24. táblázat utolsó két sora és a 16.ábra redundáns
63.o. “az interferencia értékek egyik eCB szintjének változásával nem állt összefüggésben“
67.o. 5-HT bevezetve 9.o.; potenciáis; 5-TT ?
68.o. “pontszámmal mutatott”
68.o. “5-HTTaktivitás“ itt kerül elő hirtelen ez a rövidítés
69.o. csökkenésével
70.o. stress (magyarul stressz); agonsitával; “igazolták. Hogy” (vessző)
72.o. jellemzhető; gyóygszer

73.o. akitvációját; glukorkortikoidok; "Stressz hatás esetén tehát" ez a mondat semmivel nincs megalapozva, a "tehát" nem indokolt benne, de egyébként is a levegőben lóg az állítás.
74.o. szignifkánsan; "zavarba szenvedő"; aminsoavcserével; sejtekekben; "szorongással összefüggése a hippokampális inflammációval"; "A CB2R KO egerek károsodott averzív memóriával" ?
75.o. gyremekkori; ineterakciós
76.o. dependnes; teljesen irreleváns a lap alján a memória-folyamatok említése; jól szórakoztam viszont az "ez az asszociáció a *p*-érték korrekciót nem élte túl" kifejezésen:)
77.o. LTP korábban bevezetve (lásd 74.o.); kulcsszsereplőnek; PFC: nincs bevezetve és a rövidítésjegyzékben se szerepel; "Mint arra korábban kiértünk" :)
78.o. dimenzói
80.o. "az szuicidális kísérlet"; " patkányok agyában a nőstény állatok agyában"
81.o. Cbns1 és Cbns0 elírás, máshol Cnbs szerepelt. Nagyon zavaró, hogy az 56.o.-n a kontroll csoport magasabb értékeiről esik szó, így hirtelen a megbeszélésben megjelenő alacsonyabb értékek érthetetlennek tűntek (ugyebár a viszonyítási alap, a megbeszélésben- helyesen- a "kályha", azaz a kontroll csoport).
82.o. depersszióban
84.o. kutatásbna; egydileg; vizgsálatainkban; megerőstítettünk
85.o. antideprresszívumok
86.o. stress; neuorgenézis

7. Választ igénylő kérdések és megjegyzések

1. 8.o. A 2-AG és az AEA a CB1 és CB2-es receptorokhoz kötődik. Mi a helyzet a NEA-val?
2. 10.o. “A CB1R Gs és Gq proteinnel való kapcsolódását bizonyos körülmények között kimutatták” Mitől függ, hogy a CB1R ligandkötés Gi vagy esetleg Gs utat aktivál-e?
3. 18.o. Az irodalmi hivatkozások szerint a magas frekvenciájú rTMS növeli, míg az alacsony frekvenciájú csökkenti a kortikális aktivitást, mégis mindkettő hatékony volt MDD-ben. Hogy tudná magyarázni ezt az ellentmondást?
4. 22.o. “Más szerzők arról számoltak be, hogy a napi kannabisz és dohány használat emelkedése emeli a pszichotikus tünetek megjelenésének esélyét.“ Kikben? Anyák használták és utódokban emelkedett az esély?
5. 26.o. “A személyiségzavart a DSM-IV kritérium rendszer alapján” illetve “A beválasztási kritérium a DSM-IV feltételeinek megfelelő” mi indokolta, hogy nem a DSM-5 került alkalmazásra, holott a 13.o. is ez az újabb kötet került említésre.
6. 27.o. “Az rTMS kezelés ideje alatt az éppen alkalmazott antidepresszívumot tovább szedte a páciens a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően.” A korábban idézett rTMS vizsgálatokban is mindig kapott a páciens antidepresszánst? Nincs irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy az rTMS maga hat, és nemcsak az antidepreszívumok hatását erősíti? (lásd 85.o. is)
7. 35.o. Miért a bilaterális, különböző frekvenciájú stimuláció mellett döntöttek? A bevezetésből számomra csak az derült ki, hogy az irodalom nem egységes. Mi alapján választották ki, melyik oldal, melyik frekvenciát kapja? A kezelés hossza/alkalmazott összimpulzusszám is eltérő volt. Van ezen paramétereknek bizonyított jelentősége a kimenetel szempontjából? Lehet valamit tudni a lehetséges határmechanizmusról (a két félteke különbözőségének vonatkozásában)? A két oldali kezelés egyidőben, vagy egymás után zajlott?
8. 56.o. “aripiprazolt és ziprasidont nem alkalmaztunk egyáltalán” Nem világos, a kannabisz szedés miatt nem alkalmazták ezeket a szereket? Miért? Az egész megfogalmazás azt sugallja, hogy tudatosan adtak pl magasabb dózisokat. Vagy emelni kellett a dózisokon, mert a kisebb dózis hatástalan volt? “LAI beállítására nagyobb

esélye volt” ugyanakkor “LAI alkalmazási gyakorisága a két csoport közt nem különbözött” hogy lehet ezt az ellentmondást feloldani?

9. 60.o. Mi az értelme az egyes tesztek közötti korrelációnak?
10. 68.o. Mivel a szerotonin legnagyobb része a beleinkben van, felmerülhet, hogy a szerotonin-kannabisz interakció a belek szintjén valósulhatna meg. Ismer-e esetleg valamilyen adatot a belek kannabisz rendszeréről, illetve a bél-agy tengely szorongással való összefüggéséről?
11. 70.o. Hogy alakul a szintje a HHM tengely molekuláinak (CRH, ACTH, glukokortikoidok) FAAH szisztémás blokkolása/ agonista adása után? Ismertek esetleg lokális hatások (pl valamely agyterületbe adva megváltozik a glükokortikoid szekréció)?
12. 71.o. A 12. ábra szép összefoglaló, de nem teljesen világos, milyen neuronokat is akar megjeleníteni és melyiken hol van receptor és a hozzá kötődő molekulák honnan kerülnek oda. Kérném pontosítani!
13. 73.o. A két lipid transzmitter különböző hatásait a kapott eredmények tükrében nem igazán sikerült magyarázni a szövegben, szeretném, ha ezt bővebben kifejtené.
14. 76.o. Mi az a CACNA1C gén és mi a kapcsolata az eCB rendszerrel? Mennyire specifikus a szerepe a kannabinoid rendszerben? "Az LTCC gén expressziót szabályozó funkciója abból ered, hogy a cAMP kapcsolt régióhoz kötött fehérje (CREB) foszforilációja a membrán depolarizációtól és a Ca2+/kalmodulin-dependnes protein kináz II (CaMKII) útvonaltól függ (Tao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2012). " Az itt taglalt folyamat nem áll össze, egy magyarázó ábra nagyon-nagyon sokat segítene.
15. 77.o. Mi az a GNG12, valamint KCNJ3 gén és mi a kapcsolatuk az eCB rendszerrel?
16. 77.o. Mit kell értenünk ruminációs válaszadási stílus alatt? Mennyire kulcstünete ez a depressziónak, szorongásnak (lásd OCD, GAD)? A rumináció genetikai összefüggéseinek vizsgálatai egy kis kisiklást jelentettek a kannabinoid iránytól...
17. 79.o. "GABRG3 gén a szorongással összefüggésben, ami könnyen értelmezhető" hát lehet, hogy könnyen lehetett volna értelmezni, ha korábban egy szó is esett volna arról, hogy ez mit is kódol. És ez mennyiben tartozik az eCB jelátviteli útvonalba? (lásd 5.4. cím)
18. 82.o. " az ACC-nek és a DLPFC régióknak, melyek kulcsszereplői az AEA szint csökkenésnek," Mi ez a kulcsszerep? Hogy jön az agy a perifériás eCB szintekhez? Mit kell a HHM tengely újratöltődése alatt érteni? A 22. magyarázó ábra nem tartalmazza azt az elképzelést, hogy a két félteke más frekvenciájú ingerlése ellentétes irányú hatásokat (serkentés vagy gátlás) is ki tud váltani (lásd bevezetés).
19. 85.o. " Az ioncsatornákat, valamint a jelátviteli útvonalakat tehát tudjuk szelektíven befolyásolni az rTMS módszerével" A bemutatott adatok erre nem utalnak, az ioncsatornák vizsgálata egy másik sorozatból származik, mint az rTMS. Min alapszik ez a kijelentés?

8. Vélemény

Összefoglalva megállapítható, hogy egy szerteágazó klinikai munkát a jelölt sikeresen foglalt össze egységes vezérfonal mentén. Bár a doktori értekezés kivitelezése lehetett volna precízebb, körültekintőbb, az elvégzett kutatómunka tudományos színvonal kielégíti a követelményeket, ami alapján az értekezés nyilvános vitára bocsájtását javaslom és a munkát érdemesnek tartom az MTA doktori cím elnyerésére.

Pécs, 2022.10.06.

Prof. Dr. Zelena Dóra; MD, PhD, DSc, Med Habil; igazgató

Élettani Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem