Válasz Prof. Dr. Zelena Dóra opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni, hogy professzor asszony vállalta a dolgozatom bírálatát. Köszönöm továbbá a részletes és alapos bírálatát, építő jellegű javaslatait. Kérdései, megjegyzései elgondolkodtatóak és sokszor inspirálóak voltak számomra, ezek a további munkám során is tanulsággal szolgálnak.

A dolgozat egészét érintő általános megjegyzéseit köszönettel elfogadom, a kritikai észrevételekkel többségében egyet értek. Néhány megjegyzésre a következőket szeretném válaszolni:

A formai (elsősorban gépelési) hibákért elnézést kérek, sajnos technikai okok miatt a dolgozat hibás formája került kiküldésre.

Az ábrák egy részének spekulatív minősítését elfogadom. Ugyanakkor ezek az ábrák sematikusak, illetve jellegüknél és a témánál fogva minden részletre kiterjedően nem is lehetnek realisztikusak. Emellett minden ábra készítését a saját eredményeimen túl irodalmi adatokra alapoztam és azzal a céllal készítettem ezeket, hogy saját eredményem az irodalomban megtalálható adatokkal együtt értelmezhető és áttekinthető legyen.

Professzor asszony a Bevezetőben a stresszválaszról szóló részt feleslegesnek érezte, azonban a stresszválasz az egész dolgozat központi eleme, ezért elengedhetetlennek érzem a Bevezetőben. A főbb eredményeim éppen a gyermekkori trauma, mint stresszhatás és a genetikai polimorfizmusok interakciójára irányulnak. Az endokannabinoid rendszer szerepét a stresszválasz regulációban célzottan és részletesen tárgyalom a Megbeszélés fejezetben is, hiszen kutatási eredményeim jelentős része ezzel a témával kapcsolatos.

Ugyanakkor olyan témák részletesebb bevezetését hiányolja professzor asszony, mint pl. a különböző antipszichotikumok közötti hatástani különbség, vagy hogy miért a DLPFC felett alkalmaztuk az rTMS kezelést. Ezeknek a témáknak a taglalását terjedelmi okok miatt és amiatt, mert úgy gondoltam, hogy evidenciának számítanak, kevésbé részletesen fejtettem ki, de remélem, hogy a válaszaimban sikerül ezt valamelyest pótolnom.

A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms (KEGG) adatbázis alkalmazásának elméleti hátteréről valóban lehet, hogy részletesebben írhattam volna, bár mindenképpen a Módszerek fejezetben érzem indokoltnak ennek tárgyalását. A KEGG, mint számos egyéb ingyenesen hozzáférhető elektronikus adatbázis, a genetikai kutatások eredményeiből származó intenzíven növekvő adatok megosztására szolgál. Ezeknek a platformoknak a segítségével tanulmányozhatók és kiválaszthatók különböző biológiai folyamatokban közreműködő fehérjéket kódoló génkészletek (gene sets). Az endokannabinoid jelátviteli útvonal vizsgálatához a KEGG adatbázist használtuk az analizálni kívánt génkészlet kiválasztásához (ld. 33. oldal). Azért választottuk ezt a módszert, mert a szakirodalomból az derült ki, hogy mind a kandidáns génpolimorfizmus vizsgálatokhoz, mind a teljes genom

asszociációs vizsgálatokhoz (GWAS) képest előnyösebb megközelítést jelent, ha célzottan a biológiai útvonalakhoz tartozó gének kiválasztására épül a kutatás (Kao et al. 2012; Wang et al. 2010), amint erre a disszertációban utaltam (12. oldal). Az egyes polimorfizmusok esetén túl kicsi az egyéni hatás, hogy mérhető legyen, a GWAS esetén viszont túl nagy az asszociációs tesztek száma, ami statisztikailag nehezíti a szignifikancia szint megállapítását (Wang et al. 2010). Továbbá, ha jelátviteli útvonalat vizsgálunk, akkor lehetőségünk van a különböző útvonalakat keresztező metszéspontokat megtalálni, ahol a génvariáns hatása amplifikált módon jelenik meg, hiszen egyszerre több útvonalat érint, így populációs szinten nagyobb az esély, hogy hatása eléri a szignifikanciaszintet. Saját eredményeink egybehangzóan korábbi GWAS eredményekkel éppen egy ilyen gén, a CACNA1C gén hatását igazolta, hiszen a feszültségfüggő-kalciumcsatorna módosulása minden olyan útvonal hatását érinti, amely a neurotranszmitter felszabadulását befolyásolja.

A ruminációról részletesen nem írtam a bevezetőben, ugyanakkor a depresszió klinikai ismereteit külön alfejezetben tárgyaltam és mivel a rumináció nem más, mint a depresszió egy tünete, ezért úgy vélem, következtetni lehetett a jelentőségére, de a 16. kérdésre adott válaszban is kitértem erre a témára.

A vizsgálati módszerekre vonatkozó részben a több vizsgálati minta (manchesteri, budapesti és würzburgi minták) összehasonlításáról szóló bírálathoz annyit szeretnék megjegyezni, hogy a reprodukálhatóság elmaradása nem feltétlenül a módszer gyengeségét bizonyítja. A poligénes, multifaktoriális kórképek vizsgálatának módszertani elemzései arra utalnak, hogy nagyon sok, apró hatást kellene detektálni, mely hatások egyenként nem érik el a statisztikailag kimutatható erősséget; többek között ezzel magyarázható a pszichiátriai betegségek genetikai hátterével kapcsolatos eredmények heterogenitása. Ugyanakkor eredményeink egy része éppen egymást erősítették, hiszen a CACNA1C és a KCNJ gének esetén különböző mintákban sikerült az asszociációt igazolni.

A Spielberger-féle Állapot-vonásszorongás kérdőív (State-Trait Anxiety Inventory, STAI) elnevezését a szakirodalom alapján alkalmaztam. A skála magyar fordítását és validálását Sipos és mtsi. 1978-ban publikálták (maga Spielberger is részt vett a validálásban), tehát több, mint 40 éve, ezért egyet értek azzal, hogy nevének revidiálása időszerű lehet.

A bíráló konkrét kérdéseire az alábbiakban szeretnék válaszolni:

1. **8.o. A 2-AG és az AEA a CB1 és CB2-es receptorokhoz kötődik. Mi a helyzet a NEAval?**

Az N-acil-etanolaminok (N-palmitoil-etanolamin, N-oleoil-etanolamin, N-dokozahexa-enoil-etanolamin és metabolitjaik) a CB1 és a CB2 receptorok mellett a GPR55, GPR110, GPR119 receptorokhoz, ioncsatornákhoz (TRPV1) és magreceptorokhoz (PPAR-α és PPAR-γ) kötődnek (Mock et al. 2022). A NEA-k szintje kórosan változik meg malignus folyamatokban, obezitásban és neurodegeneratív betegségekben, ezért a figyelem fókuszába kerültek, mint potenciális farmakológiai támadáspontok (Mock et al. 2022).

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?**

Bár az első vizsgálatok egyértelműen a CB1 receptor és a G_i kapcsolódását és a következményes cAMP szint csökkenésen keresztül megvalósuló inhibitoros hatást igazolták (Hillard et al. 1999). Később azonban kimutatták, hogy a CB1 receptor a G_s fehérjéhez is képes kapcsolódni Pertussin toxinnal előkezelt sejtvonalban, sőt, akár egyszerre képes kötődni mindkét fehérjéhez (Peters and Scott 2009). Chen és mtsai 2010-ben publikálták a British Journal of Pharmacology-ban közleményüket, melyben arról számoltak be, hogy az intracelluláris kalciumszint a CB1 receptor agonista dózisának emelésével nő, továbbá azonosítottak egy strukturális elemet, amely befolyásolja a kapcsolódás minőségét. Eredményeik szerint a CB1 receptor 2. sejten belüli hurok részének (intracellular loop 2, ICL2) struktúrája felel azért, hogy a G_i vagy G_s proteinhez kapcsolódik és ettől függően az adenilil-cikláz gátlódik vagy a cAMP aktiválódik. A szerzők azt is leírták, hogy a kódoló régióban található Leu-222 mutációnak meghatározó szerepe van ebből a szempontból, mivel az Ala vagy Pro esetén a G-fehérje a G_s vagy a G_i proteinnel kapcsolódik; míg Ile vagy Val esetén egyforma eséllyel kapcsolódik mindkettőhöz (Chen et al. 2010). Az, hogy az agonista dózisának emelésével az inhibitoros hatás stimulálóvá válik, magyarázhatja a stresszhatás ismétlődése esetén észlelt váltást a stressztengely gátlásának csökkenésében, azaz, hogy a fokozódó CB1 receptor aktiválás egy ponton túl nem gátolja, hanem fokozza a HHM aktivitását.

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?**

Köszönöm a kérdést. Képalkotó és neurofiziológiai vizsgálatok eredményei megerősítették, hogy a depresszióban szenvedő páciensek baloldali dorsolateralis prefrontalis kortexében (DLPFC) csökkent, míg a jobboldali területen emelkedett neuronális aktivitás (Bajwa et al. 2008; Fitzgerald et al. 2008; Grimm et al. 2008; Hecht 2010). Ennek alapján dolgozták ki a magas frekvenciával (high frequency, >5Hz) történő stimulációs protokollt a baloldali DLPFC felett (amely növeli a kortikális excitabilitást) és a jobboldali DLPFC felett az alacsony frekvenciás kezelés protokollját (low frequency, 1Hz≥), amely csökkenti a kortikális excitabilitást) (Fitzgerald et al. 2006). Később kidolgozták a két kezelési típus kombinációját, mely során egy ülésben (de konszekutívan, azaz egymás után) mindkét oldalon történik kezelés („bilaterális stimuláció") feltételezve, hogy a kétoldali stimuláció hatása kiegészíti egymást. Az összehasonlító vizsgálatok szerint a bilaterális kezelés ugyanolyan jól tolerálható, míg a hatékonysága jobb, mint az unilaterális kezelésé (Blumberger et al. 2012), bár az eredmények nem teljesen konzisztensek (Aaronson et al. 2022). 2017-ben, a JAMA Psychiatry-ban publikált jelentős cikkben az alacsony frekvenciával végzett és/vagy bilaterális eljárást találták a leghatékonyabb kezelési formának (Brunoni et al. 2017). A NICE guideline a bilaterális kezelésre jobb válaszkészséget igazoló eredményre hivatkozik, míg a remissziós

ráta nem különbözik az unilatreális technikától (NICE guideline, 2015). A neurobiológiai vizsgálatok eredményei mindenesetre egyértelműek arra vonatkozóan, hogy a bal,- és a jobboldali DLPFC alacsony frekvenciájú stimulációja különböző konzekvenciákkal jár az agyban. Noda (2021) EEG vizsgálata szerint a jobboldali DLPFC alacsony frekvenciájú kezelése nem is inhibitoros hatással bír, hanem tulajdonképpen normalizálja a bal és a jobboldali prefrontális aktivitás egyensúlyát (Noda 2021). Egy friss tanulmány igazolta, hogy a jobboldali DLPFC alacsony frekvenciával történő stimulációja során a kortiko-striatalis-talamo-kortikalis (CSTC) kör (melynek diszregulációja fontos szerepet játszik a depresszió patomechanizmusában) aktivációja figyelhető meg, míg ugyanezt a baloldali DLPFC alacsony frekvenciával történő stimulációjával nem lehet kiváltani (Caparelli et al. 2022).

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?**

A disszertációból idézett rész arra vonatkozott, hogy maguknál a használóknál jelennek meg pszichotikus tünetek nagyobb eséllyel.

Kannabiszt használó anyákat követő vizsgálatok egyre nagyobb számban állnak rendelkezésre. A metaanalízisek eredményei arra utalnak, hogy az újszülöttek kisebb testsúllyal születnek, jellemző lehet rájuk a tremor és a rendellenes alvásmintázat (El Marroun et al. 2018). Serdülőkorban memória-, és figyelemzavar, valamint depresszió jelenhet meg, de ezek az adatok nem tekinthető konzisztensnek (El Marroun et al. 2018).

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?**

Az a magyarázat, hogy a vizsgálat tervezése és engedélyeztetése idején még a DSM-IV volt érvényben, a DSM-5 verziót 2013-ban publikálták.

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)**

Köszönöm a kérdést. Az rTMS kezelés a vizsgálatok szerint önmagában is hatékony rövidtávon (NICE guideline, 2015; EMMI egészségügyi szakmai irányelv major (unipoláris) depresszív zavar: diagnosztikai és terápiás irányelvek, 2021). A hatékonyságot bizonyító vizsgálatokban az aktív rTMS kezelést hasonlítják a placebó (sham) kezeléshez (nem gyógyszeres kezeléshez). A klinikai ajánlásokban az rTMS általában másodvonalbeli alkalmazása javasolt, azaz legalább 1 antidepresszívum hatástalansága után lehet alkalmazni. A gyógyszeres kezelést azért javasolt már az rTMS idején is alkalmazni, mert az rTMS kezeléssorozatot követően az antidepresszívum a fenntartó kezelésben fontos szerepet

játszik (hasonlóképpen, mint a legelterjedtebb neuromodulációs technika, az ECT kezelés során).

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?**

Az irodalmi adatok alapján és a feltételezett (azóta részben igazolt) komplexebb neurobiológiai hatás miatt választottunk ezt a protokollt. A bilaterális kezelés konszekutív módon (azaz egy terápiás ülés során előbb az egyik, majd a másik oldal megfelelő paraméterekkel történő ingerlése) történt. A két oldalra leadott kezelések impulzusszáma és időtartama a szakirodalom alapján lett megállapítva; a két oldali kezelés paraméterei, azaz a frekvencia, az összimpulzusszám és az ülés hossza tekintetében is eltér (Dome et al. 2020). A döntésünkhöz vezető többi szempontot, illetve a bilaterális kezelés elméleti hátterét ld. még a 3. kérdésre adott válaszban.

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?**

Az első megállapítás mindössze arra vonatkozott, hogy az összes egyéb típusú antipszichotikumot alkalmaztuk a kannabniszt nem szedő csoportban ($Cbns_0$), kivéve az aripiprazolt és a ziprasidont, mely megállapítás leíró jellegű és az adatok retrospektív elemzéséből származik A dózisok összehasonlítását elvégeztük a vizsgálatban, a részleteket ld. a 23. Táblázatban. Az antipszichotikumok dózisa a $Cnbs_1$ csoportban általában alacsonyabb volt (szignifikánsan alacsonyabb dózisokat alkalmaztunk kvetiapin és olanzapin esetén), míg a benzodiazepin dózisok magasabbak voltak ebben a csoportban (mind alprazolam, mind klonazepam esetén). A „nagyobb eséllyel került beállításra" és az „alkalmazási gyakoriság" kifejezések különböző folyamatokra utal. A beállításra való esély azt jelenti, hogy milyen eséllyel állítunk be egy páciensnél LAI-t. Az alkalmazási gyakoriság azt jelenti, hogy milyen időközönként kerül sor a LAI adására.

9. **60.o. Mi az értelme az egyes tesztek közötti korrelációnak?**

A korrelációs próbának az volt a célja, hogy teszteljük az egyes pszichometriai skálák átfedését a vizsgálati mintában. Az eredmények szerint az önkitöltős depresszió skála (Beck-féle Depresszió Skála) és az interjú alapú Montgomery-Asberg Depresszió Skála (MADRS) skála erősen korrelált, ugyanakkor a Beck-féle Szorongás Leltárral mért tünetprofil

különbözött az előbbi kettőtől. Fontos eredmény, hogy az anhedóniát mérő Snaith-Hamilton féle Anhedónia Skála (SHAPS) kérdőív egyáltalán nem korrelált a MADRS skálával, ami arra utal, hogy az anhedónia egy olyan (egyébként központi) ún. magtünet, amit a MADRS nem mér elkülönülten. Az anhedóniára vontakozó eredményeink szempontjából meghatározó jelentősége van utóbbinak, hiszen az rTMS kezelés specifikus hatása anhedóniára vonatkozóan egyedülálló.

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?

Az irritábilis bél szindróma pathomechanizmusával foglalkozó kutatásokban leírták a szorotonin és az amandamide kapcsolatát. Az 5-HT3 receptor mediálta duodenalis fájdalomcsillapító hatás CB1 receptor függő és a krónikus 5-HT kezeléshez társuló hyperalgesia a csökkent anandamid szinttel mutat összefüggést (Spiller 2011). Mivel az irritábilis bél szindrómát a fizikális hatásokon túl pszichoszociális stressz is előidézi, felmerül a bél-agy tengely szerepe is. Emellett a krónikus gyulladásos bélbetegségekhez (IBD) társuló szorongásos és depressziós tünetek a bél-agy tengely modell egyik legismertebb példája (Mazzanti et al. 1998). A krónikus gyulladás következtében kialakult citokin változások az agyban is változásokat idéznek elő. Egyrészt a különböző CD antigént kódoló gének kiütött (KO) változatát hordozó egerek vizsgálatai szerint szorongás, depresszió, anhedónia, tanulási nehézség alakul ki (Mazzanti et al. 1998). Más adatok arra utalnak, hogy a nervus vagus direkt kapcsolaton keresztül közvetíti az agytörzsbe az inflammatórikus, valamint nociceptív jeleket (Mazzanti et al. 1998). Ennek fordított esetben is van jelentősége, hiszen mind a depresszió, mind az IBD kezelésében a n. vagus stimuláció ismert terápiás eszköz. A krónikus szorongás esetében a szisztémás szubklinikai gyulladás, mint pathomechanizmus ismert teória, ehhez kapcsolódik a CB2 receptor gén, a gyermekkori trauma interakciója és a felnőttkori szorongásra való hajlam összefüggését igazoló vizsgálatunk is (Lazary et al. 2019). Mivel a CB2 receptor a gyulladásos folyamatok csökkenésében játszik szerepet, hasonlóan a fentiekhez, krónikus bélgyulladásban az inflammatórikus folyamatok a CB2 receptor érzékenységén/expresszióján keresztül megváltozhat az érzelmi szabályozás és fordítva; krónikus szorongás esetén az endokannabinoid rendszer érzékenységének megváltozásával a vázolt útvonalon keresztül visszahathat a gyomor-bél rendszer működésére.

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)?

Az endokannabinoid rendszer komplex és kifinomult módon vesz részt a stresszválasz szabályozásában, amint erről a dolgozatban is írtam (10. oldal, 1.3. fejezet: Az eCB rendszer

szerpe a stresszválasz szabályozásában). Az állatkísérletes adatok szerteágazóak ebben a témakörben, a legfontosabb eredményeket emelném ki a válaszomban:
A FAAH szisztémás blokkolása patkányban a stresszválasz során emelkedett CORT szintet fáziskéséssel csökkentette. A PVN területén a stresszelt állatban emelkedett a CRH szint, majd a FAAH blokkolása következtében szignifikánsan csökkent a stresszt követő 40. percnél. A hipofízis elülső és hátulsó lebenyében egyaránt csökkentette a stressz indukálta POMC expressziót az URB597 kezelés a 40.percnél. A basolateralis amigdala magba (BLA-ba) injektált CB1 antagonista (AM251) felfüggesztette ezt a hatást (Bedse et al. 2014).
Patel és mtsai. (2004) vizsgálatában a CB1 receptor antagonista (SR141716) adása esetén emelkedett az ACTH és a kortikoszteron (CORT) szérum szintje, CB1 receptor aktiválása gátolja a glutamáterg serkentő hatást a PVN neuronokon. A FAAH inhibitor (URB597) adása csökkentette a szérum CORT szintjét (Patel et al. 2004).
Fontos megjegyezni, hogy ezek a hatások kontextus és dózisfüggők, azaz stresszhatás esetén a CORT szintje akár 10-szeresére emelkedik stresszmentes állapothoz képest ugyanolyan dózisú SR141716 kezelést alkalmazva. Alacsony dózisban a CB1 receptor agonista csökkenti a HHM aktivitást, míg magas dózisban fokozza és fenntartja (Roberts et al. 2014).
Abban a vizsgálatban, amelyben mind a FAAH, mind a MAGL enzim blokkolását tesztelték, azt találták, hogy az URB597 kezelés nem, csak a JZL184 kezelés emelte a CORT koncentrációt, ami a 2-AG szerepét erősíti a stresszválaszt követő nyugalmi állapotba való visszaállásban (Roberts et al. 2014). Utóbbi eredmény a saját vizsgálatunk eredményével áll összhangban, hiszen a klinikai mintánkban szintén a 2-AG (és nem az AEA) változása mutatott korrelációt a klinikai tünetek javulásával.
Hill és mtsai. (2009) vizsgálták a FAAH inhibitor lokális hatását a stresszhormonok szintjére. A bazális amigdala magba adott URB597 infúzió a stressz által megemelkedett CORT szintet csökkentette szignifikáns mértékben (de csak 0,1mg dózisban; 1mg esetén ez a hatás elmaradt-valószínűleg azért, mert az AEA magasabb koncentrációban elveszíti CB1 receptor szelektivitását és már a TRPV receptorokhoz is beköt). A FAAH inhibitor beadása a centrális, valamint mediális amigdala mag területére nem volt hatással a kortikoszteron szintre (Hill et al. 2009).

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!

A 71. oldalon a 19.ábrán preszinaptikus glutamáterg neuron és a hipotalamusz paraventrikuláris magban (PVN) található parvocelluláris neuron közötti szinapszist ábrázoltam Di és mtsai munkája nyomán (Di et al. 2003; Di et al. 2009). A keringő glukokortikoid stresszhatás esetén megemelkedik a vérben, ezáltal nő a CRH kiáramlás a portalis keringésbe, az ACTH felszabadulása szintén emelkedik a hipofízis elülső lebenyéből, valamint a CORT kiáramlása is fokozódik a mellékveséből. A megemelkedett glukokortikoid a membránhoz kötött glukokortikoid receptoron (mGR) keresztül fokozza az endokannbinoid felszabadulást és a preszinaptikus CB1 receptor aktiválásán keresztül negatív feedback hatás

kialakulásához járul hozzá, azaz a parvocellularis neuronok aktiválása csökken (CB1 receptor által gátolt glutamát felszabadulás miatt) és a CRH felszabadulás szintén lecsökken.

13. **73.o. A két lipid transzmitter különböző hatásait a kapott eredmények tükrében nem igazán sikerült magyarázni a szövegben, szeretném, ha ezt bővebben kifejtené.**

Köszönöm a kérdést. Az AEA tónusos formában egyenletes expresszióval biztosítja a HHM tengely nyugalomi állapotát, azaz tónusos gátlás alatt tartja (Steiner et al. 2008). Akut stressz esetén a glukokortikoid receptor aktiválásán keresztül a FAAH aktivitása megnő, az AEA hidrolízise felgyorsul, az AEA koncentráció lecsökken, vagyis átmenetileg megszűnik a HHM gátlása (Steiner et al. 2008). A stressz hatására így aktiválódni tud a HHM tengely. Ugyanakkor bizonyos idő elteltével, vagy ismételt stressz hatás esetén a 2-AG szintje emelkedni kezd, ami a CB1 receptor aktiválásán keresztül a HHM ismételt gátlását biztosítja; azaz a stresszválaszt követően a HHM nyugalomi állapotba történő visszaállításában („deactivation") van szerepe (Steiner et al. 2008). A depressziós tünetek kialakulásában a krónicizálódott stresszen keresztül a HHM rendszer állandósult aktivációjának van kulcsszerepe. Saját eredményünk ezeket az állatkísérletes adatokat erősítette humán klinikai vizsgálatban, mely szerint az rTMS kezelés a 2-AG emelkedésén keresztül volt képes csökkenteni a tüneteket, míg az AEA szint nem változott a kezelés hatására.

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**

A CACNA1C az L-típusú feszültségfüggő kalcium csatorna (L-type voltage-gated calcium channel; VGCC/LTCC) α_1 alegységét kódoló génje, mely fontos szerepet játszik a neuronális excitabilitás, a szinaptikus plaszticitás és a neurogenezis folyamataiban (Catterall 2011; Lazary et al. 2021). Az excitátoros neurotranszmitter felszabadulás kalciumfüggő folyamat, így az LTCC blokkolásán keresztül gátolható a glutamát felszabaulására gyakorolt eCB hatás(Tao et al. 2002; Wheeler et al. 2012). A VGCC szerepét a folyamatban a dolgozat 34. oldalán a 4. ábrán szemléltettem.

Az LTCC/VGCC szerepe az eCB jelátviteli folyamatban nem tekinthető specifikusnak, de a jelátviteli útvonal elemzés nem is kifejezetten azt célozza, hogy specifikus pontokat azonosítsunk, sőt, tulajdonképpen arra szolgál, hogy általánosabb folyamatok pathogenetikai hatásait meg tudjuk ragadni. Erre azért volt szükség, mert azt tapasztaltuk, hogy a hagyományos szemléletű, kandidáns génekre épülő pszichogenomikai vizsgálatok nem vezettek átütő eredményhez (ld. válasz 1. oldal utolsó bekezdés és 2. oldal, első bekezdés).

15. 77.o. Mi az a GNG12, valamint KCNJ3 gén és mi a kapcsolatuk az eCB rendszerrel?

A GNG12 gén a G-fehérje heterotrimerikus komplexusából a γ12 alegységét (guanine nucleotide binding protein, gamma 12) kódolja és a gliasejtekben expresszálódi. Lipopoliszacharid (LPS) indukálta mikroglia reakció során a GNG12 gén expressziója szignifikánsan emelkedett a korai szakaszban (3-6 óra között), ami gén által kódolt fehérjének az agyi inflammatórikus kaszkádban betöltött szerepére utal, méghozzá a gyulladásos folyamat szupressziójában (Larson et al. 2010).

A KCNJ3 gén a befelé egyenirányító kálium csatorna (úgyis hívják, hogy G-protein aktiválta csatorna, GIRK) J csoportjába tartozó 3. alegységét kódolja (a dolgozatban a 77.oldalon tértem ki erre). Ezek a csatornák az inhibitoros hatását közvetíti a GABA, az opioid, az adenosin és a szerotonin neurotranszmittereknek, illetve a neuronális ingerlékenység, valamint a sejt nyugalmi potenciálja és a tüzelési aktivitás szabályozásában vesznek részt. A GIRK csatornák direkt aktivációját idézik elő a Gi/o fehérje aktivációja, amely számos jelátviteli útvonalhoz köthető, többek között az eCB rendszerhez is (Lazary et al. 2011).

Mind a GNG12, mind a KCNJ3 gének közreműködnek az eCB jelátviteli útvonalban, hiszen ezeket a géneket a vizsgálatba éppen az eCB jelátviteli útvonal elemzése során választottuk ki a KEGG adatbázis segítségével. Az útvonalhoz tartozó folyamatokat a dolgozatban a 34. oldalon található 4. ábra szemlélteti.

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...

A ruminációs válaszadási stílus egy meghatározott kognitív mintázatot jelent, mely jellegzetes tünete a depressziónak és a legtöbb szorongásos zavarnak (mint amilyenek a kényszerbetegség és a generalizált szorongásos zavar is). A páciens akár a legegyszerűbb kérdést feladathelyzetnek éli meg és nehezen vagy egyáltalán nem tud döntést hozni a lehetséges válaszok kiválasztása során, így a válaszadási idő megnyúlik, vagy súlyos esetben a válasz adása elmarad. A lehetséges válaszokra gondolatban újra és újra visszatér, ismételgeti. Éppen annak kapcsán, hogy ez a kognitív jellegzetesség több különböző diagnózison átívelő vulnerábilis vonásként is értelmezhető, az általunk leírt többszintű genetikai asszociáció beleillik abba a teóriába, amelynek alapja az affektív zavarok hátterében húzódó molekuláris-neuronális-kognitív konstelláció. Mivel a budapesti (BP) és a manchesteri (MN) minták nem klinikai populációt reprezentálnak, míg a würzburgi minta klinikai esetekből áll, adataink alapján a rumináció nem annyira a depressziónak, mint inkább a negatív emocionalitás és a genetikai vulnerábilitás közötti intermedier fenotípusnak tekinthető.

A kannabinoid témához úgy kapcsolódott a ruminációs vizsgálat (amint erről a dolgozat 77.oldalán írtam), hogy az eCB jelátviteli útvonal kapcsán szignifikáns hatásának bizonyuló gén szintén szignifikáns interakciós hatása igazolódott a ruminációval összefüggő vizsgálatunkban is, ráadásul utóbbit 2 független mintában igazoltuk.

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)

A GABRG3 gén a GABA receptor G3 alegységét kódolja. Szerepének értelmezése azért lehet könnyű, mert a legszélesebb körben alkalmazott szorongásoldók, a benzodiazepinek a GABA receptoron keresztül hatnak. Úgy szintén visszautalok az előző kérdésekre adott válaszokra, mely szerint az összes gén kiválasztása az eCB jelátviteli útvonalhoz tartozik. Ez esetben jól ismert tény, hogy CB1 receptor expresszálódik a GABAerg neuronokon is, és aktivációja esetén gátolja a GABA felszabadulását. Mivel mindkét (GABAerg és a Glutamáterg) rendszeren képes érvényesülni az eCB hatása, a különböző szabályozó körökön érvényesülő komplex hatás meghatározó a szorongás oldásában.

18. 2.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).

A mondat eleje arra vonatkozik, hogy az rTMS kezelés során a neurostimuláció igazoltan a DLPFC, valamint az ACC területére fókuszálódik. Mivel a stimuláció tekinthető egy szabályos, de mégis stressz hatásnak, az eCB rendszerre ez úgy hat, hogy az AEA szint lecsökken, majd a hatás ismétlődését követően a 2-AG szint emelkedése várható, mely következményt méréssel igazoltunk a periférián. A 2-AG emelkedése igazoltan közreműködik az aktivált HHM tengely nyugalmi állapotba való visszatérésben. (Az újratöltődés az angol „restoring" kifejezés fordítása, mely erre a folyamatra utal).

A periférián mért 2-AG és AEA szint változásából következtetni lehet a centrális (agyban) történő változásokra, mivel az endokannabinoidok átjutnak a vér-agy-gáton (Mechoulam et al. 1998; Willoughby et al. 1997). A perifériális endokannabinoid szinttel kapcsolatban más munkacsoport is végzett vizsgálatot, pl.: Hill és mtsai. a nőkben megváltozott perifériális 2-AG szérum szintet írtak le (Hill et al. 2008).

A két félteke különböző típusú folyamatairól a 3. és 7. kérdésre adott válaszomban írtam. A 2-AG szint változása és az rTMS hatása közötti összefüggésre nem feltétlenül van hatással a féltekeiség, mint ahogy erre kitértem, a hatás nem ellentétes a tüneteket tekintve, hanem kiegészítik egymást.

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?

Jogos felvetés, pontosítom a megfogalmazást: nem az ioncsatornákat tudjuk szelektíven befolyásolni az rTMS kezeléssel, hanem a depresszió pathomechanizmusában szerepet játszó agyi területeket, így azokat az ioncsatornákat, melyek a kérdéses agyi területeken találhatók. Az ioncsatornákra vonatkozó állítás arra utalt, hogy éppen a neurális ingerlékenységet meghatározó fehérje alegységeket kódoló génekről mutattuk ki, hogy összefüggést mutatnak a szorongásos depressziós fenotípussal, miközben a neurális ingerlékenység központi szerepet játszik a neurostimulációs kezelésben is, így a különböző vizsgálati megközelítések más-más úton ugyanahhoz a pathogenetikai elemhez vezettek el az affektív zavarok vonatkozásában.

Remélem, hogy sikerült a kérdésekre egzakt módon válaszolnom és professzor asszony elfogadásra érdemesnek tartja azokat.

Tisztelettel:

dr. Lazáry Judit

Budapest, 2022.10.21.

Irodalomjegyzék

Aaronson, S. T., et al. (2022), 'Comparison of clinical outcomes with left unilateral and sequential bilateral Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) treatment of major depressive disorder in a large patient registry', *Brain Stimul,* 15 (2), 326-36.

Bajwa, S., et al. (2008), 'Impaired interhemispheric interactions in patients with major depression', *J Nerv Ment Dis,* 196 (9), 671-7.

Bedse, G., et al. (2014), 'Role of the basolateral amygdala in mediating the effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on HPA axis response to stress', *Eur Neuropsychopharmacol,* 24 (9), 1511-23.

Blumberger, D. M., et al. (2012), 'A randomized double-blind sham-controlled comparison of unilateral and bilateral repetitive transcranial magnetic stimulation for treatment-resistant major depression', *World J Biol Psychiatry,* 13 (6), 423-35.

Brunoni, A. R., et al. (2017), 'Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for the Acute Treatment of Major Depressive Episodes: A Systematic Review With Network Meta-analysis', *JAMA Psychiatry,* 74 (2), 143-52.

Caparelli, E. C., et al. (2022), 'Low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation to the right dorsolateral prefrontal cortex engages thalamus, striatum, and the default mode network', *Front Neurosci,* 16, 997259.

Catterall, W. A. (2011), 'Voltage-gated calcium channels', *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 3 (8), a003947.

Chen, X. P., et al. (2010), 'Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i)', *Br J Pharmacol,* 161 (8), 1817-34.

Di, S., et al. (2003), 'Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism', *J Neurosci,* 23 (12), 4850-7.

Di, S., et al. (2009), 'Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways', *J Neurosci,* 29 (2), 393-401.

Dome, P., et al. (2020), '[The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in the treatment of major depressive disorder: theoretical and practical considerations]', *Psychiatr Hung,* 35 (2), 146-74.

El Marroun, H., et al. (2018), 'An epidemiological, developmental and clinical overview of cannabis use during pregnancy', *Prev Med,* 116, 1-5.

Fitzgerald, P. B., Fountain, S., and Daskalakis, Z. J. (2006), 'A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition', *Clin Neurophysiol,* 117 (12), 2584-96.

Fitzgerald, P. B., et al. (2008), 'A meta-analytic study of changes in brain activation in depression', *Hum Brain Mapp,* 29 (6), 683-95.

Grimm, S., et al. (2008), 'Imbalance between left and right dorsolateral prefrontal cortex in major depression is linked to negative emotional judgment: an fMRI study in severe major depressive disorder', *Biol Psychiatry,* 63 (4), 369-76.

Hecht, D. (2010), 'Depression and the hyperactive right-hemisphere', *Neurosci Res,* 68 (2), 77-87.

Hill, M. N., et al. (2008), 'Serum endocannabinoid content is altered in females with depressive disorders: a preliminary report', *Pharmacopsychiatry,* 41 (2), 48-53.

Hill, M. N., et al. (2009), 'Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis', *Neuropsychopharmacology,* 34 (13), 2733-45.

Hillard, C. J., et al. (1999), 'Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1)', *J Pharmacol Exp Ther,* 289 (3), 1427-33.

Kao, C. F., et al. (2012), 'Enriched pathways for major depressive disorder identified from a genome-wide association study', *Int J Neuropsychopharmacol,* 15 (10), 1401-11.

Lazary, J., et al. (2019), 'A functional variant of CB2 receptor gene interacts with childhood trauma and FAAH gene on anxious and depressive phenotypes', *J Affect Disord,* 257, 716-22.

Lazary, J., et al. (2021), 'Genetic analyses of the endocannabinoid pathway in association with affective phenotypic variants', *Neurosci Lett,* 744, 135600.

Lazary, J., et al. (2011), 'Epistatic interaction of CREB1 and KCNJ6 on rumination and negative emotionality', *Eur Neuropsychopharmacol,* 21 (1), 63-70.

Mazzanti, C. M., et al. (1998), 'Role of the serotonin transporter promoter polymorphism in anxiety-related traits', *Arch Gen Psychiatry,* 55 (10), 936-40.

Mechoulam, R., Fride, E., and Di Marzo, V. (1998), 'Endocannabinoids', *Eur J Pharmacol,* 359 (1), 1-18.

Mock, E. D., Gagestein, B., and van der Stelt, M. (2022), 'Anandamide and other N-acylethanolamines: A class of signaling lipids with therapeutic opportunities', *Prog Lipid Res,* 101194.

Noda, Y. (2021), 'Potential Neurophysiological Mechanisms of 1Hz-TMS to the Right Prefrontal Cortex for Depression: An Exploratory TMS-EEG Study in Healthy Participants', *J Pers Med,* 11 (2).

Patel, S., et al. (2004), 'Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis', *Endocrinology,* 145 (12), 5431-8.

Peters, M. F. and Scott, C. W. (2009), 'Evaluating cellular impedance assays for detection of GPCR pleiotropic signaling and functional selectivity', *J Biomol Screen,* 14 (3), 246-55.

Roberts, C. J., et al. (2014), 'Endocannabinoid signaling in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis recovery following stress: effects of indirect agonists and comparison of male and female mice', *Pharmacol Biochem Behav,* 117, 17-24.

Spiller, R. C. (2011), 'Targeting the 5-HT(3) receptor in the treatment of irritable bowel syndrome', *Curr Opin Pharmacol,* 11 (1), 68-74.

Steiner, M. A., et al. (2008), 'Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice', *Pharmacogenomics J,* 8 (3), 196-208.

Tao, X., et al. (2002), 'A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF', *Neuron,* 33 (3), 383-95.

Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010), 'Analysing biological pathways in genome-wide association studies', *Nat Rev Genet,* 11 (12), 843-54.

Wheeler, D. G., et al. (2012), 'Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression', *Cell,* 149 (5), 1112-24.

Willoughby, K. A., et al. (1997), 'The biodisposition and metabolism of anandamide in mice', *J Pharmacol Exp Ther,* 282 (1), 243-7.