

A metilfenidát hatékonyságának farmakogenetikai vizsgálata figyelemhiányos/hiperaktivitás zavarban

Doktori értekezés

Angyal Nóra

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nemoda Zsófia, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Juhász Gabriella, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Tóth Máté Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kovalszky Ilona, DSc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Gáspári Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Turu Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2021

Tartalom

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi háttér	8
2.1. A figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (ADHD) tünetei és terápiája.....	8
2.2. Genetikai meghatározottság az ADHD vonatkozásában.....	10
2.3. Kandidáns gén vizsgálatok figyelemhiányos/hiperaktivitás zavarban	13
2.4. Az ADHD neurobiológiai háttere.....	14
2.5. A katekolamin rendszerek és polimorfizmusaik	17
2.6. Az ADHD farmakoterápiája	19
2.7. Farmakogenetikai aspektusok.....	23
2.8. A noradrenalin transzporter jelentősége ADHD-ban	24
2.9. A karboxilészteráz 1 (CES1) szerepe a metilfenidát lebontásában	26
2.10. A karboxilészteráz izoenzimek.....	29
2.11. A karboxilészteráz 1 gén haplotípusai.....	30
2.12. CES1 génvariációk hatásai az enzimaktivitásra	32
3. Célkitűzések	36
4. Módszerek	37
4.1. A kutatásban résztvevő személyek.....	37
4.2. DNS izolálás	40
4.3. Genotipizálási módszerek.....	41
4.4. Genetikai asszociáció analízisek	44
4.5. Metaanalízis.....	45
5. Eredmények.....	46
5.1. A noradrenalin transzporter gén asszociáció vizsgálata ADHD-val	46
5.2. A noradrenalin transzporter polimorfizmusok asszociáció vizsgálata figyelemzavarral	50
5.3. A noradrenalin transzporter gén polimorfizmusainak elemzése egy prospektív metilfenidát hatékonysági vizsgálatban.....	54
5.4. A karboxilészteráz 1 gén funkcionális polimorfizmusának elemzése a metilfenidát hatékonysági vizsgálatban.....	58
6. Megbeszélés	60
6.1. A noradrenalin transzporter gén asszociáció vizsgálata ADHD diagnózissal.....	60

6.2. A noradrenalin transzporter polimorfizmusok asszociáció vizsgálata figyelemzavarral	63
6.3. Farmakogenetikai vizsgálatok ADHD-s betegek metilfenidát terápiája során ...	66
6.4. A metilfenidátot bontó CES1 enzim genetikai vizsgálata	69
7. Következtetések.....	73
8. Összefoglalás	74
9. Summary.....	75
10. Irodalomjegyzék	76
11. Saját publikációk jegyzéke	94
12. Mellékletek	96

Ábrák jegyzéke:

1. ábra. A dopaminerg szinapszis a nucleus caudatusban (1. A.) és a prefrontális kéregben (1. B.) (Nemoda és mtsai 2011 alapján).
2. ábra: A metilfenidát kémiai szerkezete (Markowitz és mtsai 2003 nyomán).
3. ábra: A karboxilészteráz 1 (CES1) által katalizált metilfenidát lebontási folyamatok (Zhu és mtsai 2008, Patrick és mtsai 2014 nyomán).
4. ábra: A CES1 szerkezete és intracelluláris lokalizációja (Wang és mtsai 2018).
5. ábra: A CES1 enzim sztereoszelektív hidrolízise a D- és L-metilfenidát adásánál (Zhu és mtsai 2008).
6. ábra A humán karboxilészteráz (CES) gének elhelyezkedése a 16q12.2 és 16q22.1 kromoszóma régiókban (NCBI adatbázisból letöltve 2021. márciusban).
7. ábra: A CES1 gén A-D haplotípusai (Rasmussen és mtsai 2018).
8. ábra: A máj CES1 polimorfizmusainak és diplotípusainak hatása az oseltamivir hidrolízisére (Shi és mtsai 2016).
9. ábra: A D-metilfenidát koncentráció az idő függvényében (Stage és mtsai 2017).
10. ábra: A noradrenalin transzporter (NET) gén vizsgált polimorfizmusai.
11. ábra: A CES1 gén Gly143Glu SNP (rs71647871, A/G) genotipizálása RFLP módszerrel.
12. ábra: NET polimorfizmusok kapcsoltsága a Haploview program alapján.
13. ábra: A NET polimorfizmusok és az ADHD diagnózis összefüggésének metaanalízise az eset-kontroll vizsgálatok alapján, allél szerinti elemzésben.
14. ábra: A NET polimorfizmusok és az ADHD diagnózis összefüggésének metaanalízise az eset-kontroll vizsgálatok alapján, genotípus szerinti elemzésben.
15. ábra: Az ADHD-RS figyelemhiányos tünet pontszámának különbségei a leggyakoribb NET haplotípus csoportoknál.
16. ábra: A Gyermekviselkedési kérdőív (CBCL) figyelmi zavarok átlagos pontszámának különbségei az átlagpopulációs és a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegminták NET haplotípus csoportjainál.
17. ábra: Az ADHD-s betegek metilfenidát kezelésre adott válaszána metaanalízise a NET rs28386840 és rs5569 genotípus szerinti elemzésben.
18. ábra: A terápiás hatás eléréséhez szükséges metilfenidát dózisok a különböző CES1 Gly143Glu genotípus csoportokban.
19. ábra: Feltételezett hatásmechanizmus a kétféle NET haplotípussal rendelkező személyeknél a beteg és kontroll csoportban.
20. ábra: A CES1 enzim katalitikus triádját és az oxianion lyukat alkotó aminosavak szerkezeti képe és reakció mechanizmusa.

Táblázatok jegyzéke:

1. táblázat: A gyógyszeres kezelésre jól reagáló és nem reagáló ADHD-s gyermekcsoportok demográfiai és klinikai jellemzői.
2. táblázat: A NET gén polimorfizmusainak genotípus eloszlása az ADHD-s gyermek, gyermek kontroll és a nemben illesztett kontroll csoportban.
3. táblázat: A NET genetikai asszociáció elemzése a Gyermekviselkedési kérdőív (CBCL) figyelemi zavarok skáláját használva az átlagpopulációs és klinikai mintákban.
4. táblázat: A NET gén polimorfizmusainak genotípus eloszlása a metilfenidát kezelésre jól reagáló és nem reagáló ADHD-s gyermek csoportban.
5. táblázat: Az ADHD tünetsúlyossági skála értékek a NET -3081 A/T (rs28386840) genotípus csoportokban.
6. táblázat: A CES1 gén Gly143Glu (rs71647871) polimorfizmusának dimenzionális elemzése az ADHD-RS tünetbecslőskála eredményei alapján.

Mellékletek jegyzéke:

1. sz. melléklet: Figyelemhiányos/hiperaktivitási zavar (ADHD) tünetei a Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM) szerint
2. sz. melléklet: Az ADHD becslő skála szülői változatának tételei (ADHD Rating Scale, ADHD-RS PARENT magyar nyelvű változata)
3. sz. melléklet: A prefrontális kéreg feldolgozókörei (Nemoda és Tárnok 2009)
4. sz. melléklet: Monoamin pályák (Coordination of the Brain Functions, Marieb EN. Human anatomy & physiology 2004, Pearson Education könyv ábráival)
5. sz. melléklet: ADHD gyógyszeres kezelésének irányelve (részletek Pászthy és mtsai 2020 szakmai irányelvéből)
6. sz. melléklet: ADHD kezelésében használt terápiás módszerek hatáserősségi mutatói gyermekek és felnőttek körében (Franke és mtsai 2018 alapján)

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol jelentés	Magyar jelentés
ADHD	Attention Deficit/Hyperactivity Disorder	figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar
ADHD-RS	ADHD Rating Scale	ADHD tünetsúlyossági becslőskála
AUC	area under the curve	görbe alatti terület
CBCL	Child Behavior Checklist	Gyermekviselkedési kérdőív
CES1	Carboxylesterase 1 gene	karboxilészteráz 1 gén
CI	confidence interval	konfidencia intervallum
DAT (SLC6A3)	Dopamine Transporter (solute carrier family 6 member 3)	dopamin transzporter
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders	Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve
GWAS	Genome-wide association study	genom-szintű asszociáció vizsgálat
ICD / BNO	International Classification of Diseases	Betegségek Nemzetközi Osztályozása
LD	Linkage disequilibrium	kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság
MPH	Methylphenidate	metilfenidát
MRI	Magnetic Resonance Imaging	mágneses rezonancia képalkotás
NA	Norepinephrine	norepinefrin / noradrenalin
NET (SLC6A2)	Norepinephrine transporter (solute carrier family 6 member 2)	noradrenalin transzporter
OR	odds ratio	esélyhányados
PFC	Prefrontal cortex	prefrontális kéreg
PGC	Psychiatric Genomics Consortium	Pszichiátriai Genomika Konzorcium
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus
(RT-)PCR	(Real-Time) Polymerase Chain Reaction	(valós idejű) polimeráz-lánreakció
SDS	Sodium dodecyl sulfate	nátrium-lauril-szulfát
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	egy pontos nukleotid polimorfizmus
UTR	Untranslated region	nem transzlálódó régió

1. Bevezetés

Dolgozatomban a gyermekkori figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (ADHD: Attention Deficit/Hyperactivity Disorder) pszichogenetikai és farmakogenetikai vonatkozásában végzett kutatásaink eredményeit foglaltam össze. E gyakori, neurodevelopmentális zavar tünetei az esetek egy részében a felnőttkor során is perzisztálnak, ezért korai felismerése és optimális komplex kezelése (farmako- és pszichoterápia) rendkívül fontos az egészségügyi ellátásban.

Család- és ikervizsgálatok nagyfokú genetikai meghatározottságot mutattak ki az ADHD hátterében, biológiai mechanizmusainak feltérképezése pedig már az 1970-es évek óta intenzív kutatás tárgya. Korán felismerték, hogy multifaktoriális, poligénes háttérrel rendelkező kórképről van szó, azaz több gén együttes hatása, illetve környezeti faktorokkal való interakciója vezet az ADHD kialakulásához. A farmakoterápiájában használt gyógyszerek hatásmechanizmusa alapján, a genetikai kutatások első hulláma elsősorban a dopaminerg génvariánsokra irányult.

A genetikai variációk nagy része egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP: Single Nucleotide Polymorphism), melyeket széleskörűen használnak az egyéni genetikai változatosság felmérésére. Például a genom-szintű asszociáció vizsgálatok is SNP-eket mérnek. Ezek a kutatások előzetes hipotézisek nélkül vizsgálják a betegségre hajlamosító génvariánsokat több ezer beteg (ADHD-s gyermek és felnőtt) és kontroll személy adatait használva. Azonban a neurobiológiai elméletekre épülő kandidáns gén vizsgálatok a mai napig fontosak, mivel velük kisebb esetszámú, homogénebb, részletesebben karakterizált betegcsoportokat tudunk vizsgálni.

Munkacsoportunk a gyermekkori ADHD genetikai hátterének vizsgálatában az első kandidáns polimorfizmusokat a dopamin rendszer elemei közül választotta. Később, a szelektív noradrenalin transzporter (NET: norepinephrine transporter) gátló gyógyszer bevezetésével a noradrenalin rendszer vizsgálata is fókuszba került. A gyógyszeres terápia hatékonyságát meghatározó egyéni válaszkészség, és az ezzel kapcsolatos heterogenitás kiemelten fontos a klinikai gyakorlatban. A farmakogenetikai kutatások emiatt a gyógyszer metabolizmusában szerepet játszó enzimek genetikai variánsaira irányulnak. Kutatási témám ezért a metilfenidát lebontásáért felelős karboxilészteráz 1 (CES1) gén vizsgálatát is magába foglalta. Dolgozatomban a NET és a CES1 gén polimorfizmusainak vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket szeretném bemutatni.

2. Irodalmi háttér

2.1. A figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (ADHD) tünetei és terápiája

A figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar az egyik leggyakoribb neurodevelopmentális pszichés zavar, előfordulását világszinten 5% körülire becsülik gyermekek körében (Polanczyk és mtsai 2014, Moffitt és mtsai 2015). Az esetek egy részében idővel küszöb alattira csökkennek a hiperaktivitás tünetei (ezek felsorolását lásd az 1. sz. mellékletben), azonban a gyerekkorban ADHD-val diagnosztizált betegek 30–80%-ában felnőttkorban is perzisztálnak a tünetek, és a mindennapi életvezetésben funkciórontó hatásúak, így a felnőtt lakosság kb. 3%-a érintett (Faraone és Larsson 2019). Egy hazai epidemiológiai vizsgálat szerint a felnőttkori ADHD gyakorisága 2-5%, mely megfelel a nemzetközi adatoknak (Bitter és mtsai 2010). Az ADHD klinikai diagnózisának előfordulása fiúk körében gyakoribb, ennek egyik lehetséges oka, hogy a hiperaktivitással és impulzivitással járó tünetek megnyilvánulása megkönnyíti a zavar diagnosztizálását, míg a lányok esetében gyakran csak figyelemzavarral járó forma kevésbé szembeötlő a környezet számára (Pászthy és mtsai 2020).

Az ADHD diagnosztikáját illetően fontos kiemelni, hogy tüneteiszámbeli kritériuma jelentősen különbözött az elsősorban klinikai gyakorlatban használt BNO-10 diagnosztikus rendszer (Egészségügyi Világszervezet (WHO), A betegségek Nemzetközi Osztályozása, Tizedik revízió, BNO-10, 1995) és a nemzetközi kutatásban használt Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyvének 4. kiadása (DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) között. Míg a BNO-10 meghatározás igényelte mindhárom tünetcsoportból a kívánt tüneteiszámot (figyelemzavar tüneteiből legalább 6, hiperaktivitás tüneteiből legalább 3 és az impulzivitás tüneteiből legalább 1 tünet együttes jelenlétét), a DSM-IV (Amerikai Pszichiátriai Társaság 1994) legalább 6 figyelemzavar vagy hiperaktivitás/impulzivitás tünet jelenlétét kívánja meg, ez alapján ADHD altípusokat elkülönítve.

Az ADHD diagnosztikájában nagy előrelépést jelentett a DSM-5 megjelenése (Amerikai Pszichiátriai Társaság 2013), mely jelentősen hozzájárult a felnőttkori forma diagnosztizálásához (pl. az életkori kritérium kitolásával és a felnőttkori élethelyzetekre vonatkozó kérdéssorával), továbbá a jelenleg bevezetésre váró BNO-11 (mely hazánkban 2022. január 1-től fog életbe lépni). A BNO-11 ugyanis a DSM-5 rendszerhez közelít mind nomenklatúra, mind a tüneti dominancia alapján történő

altípus beosztás tekintetében, így a betegség megnevezése hiperkinetikus zavarról ADHD-ra módosul, az ADHD altípusok pedig a magtünetek jelenléte alapján a DSM rendszernek megfelelő három altípus szerinti besorolást követik (*Reed és mtsai 2019*). A tünetszámot illetően a korábbi BNO-10 rendszerhez képest így összességében a DSM-hez igazodva csökken a diagnosztikus küszöb.

ADHD diagnózisról akkor beszélünk a DSM rendszer alapján (mind a DSM-IV, mind a DSM-5 szerint, lásd 1. sz. melléklet), ha figyelemhiányos és/vagy hiperaktív-impulzív tünetekből kategóriánként legalább 6 jelentkezik és legalább 6 hónapig olyan mértékben áll fenn, ami nem felel meg az adott fejlődési szintnek. A diagnózis további fontos kritériuma, hogy a tünetek több élethelyzetben jelentkeznek (például iskolai és otthoni környezetben is). Fontos megemlíteni, hogy az impulzivitási tünetek jelenléte miatt nő az abúzus potenciál, és megnövekedhet a droghasználat valószínűsége a kezeletlen ADHD-s betegek körében (*Quinn és mtsai 2017*). Ezenkívül gyakoribb az ADHD-s fiatalok körében a dohányzás, a tanulmányaik lerövidülése, az átlagtól korábban kezdődő szexuális aktivitás és a gyermekvállalásuk is korábbra tolódik (*Faraone és Larsson 2019*).

A tüneti heterogenitása ellenére a mai napig az ADHD az egyik legjobban validált diagnózis a gyermekpszichiátriában. Sajnos a mai iskolai környezetben az ADHD-hoz köthető viselkedésformák gyakran okoznak problémát a gyermeknek és a tanárnak is, ezért fontos a tünetek korai felismerése (erre külön kérdőíveket dolgoznak ki tanárok és szülők részére, a 2. sz. mellékletben egy szülői kérdőív látható). A megfelelő tanulmányi körülmények megteremtése, a készségfejlesztés, illetve alternatív tanulási technikák tanítása nagyon fontos gyermekkorban, hiszen az ADHD-s gyermek később sok szakmában (pl. katona vagy baleseti ügyeletben dolgozó orvos) hasznát veheti hiperaktív/impulzív tulajdonságainak. A gyógyszeres terápia súlyosabb tünetek fennállása, és az alternatív stratégiák nem megfelelő hatékonysága esetén mérlegelendő (*Pászthy és mtsai 2020*). Az ADHD gyógyszeres terápiájával alapvetően kettős funkcióbéli javulás érhető el: a figyelmi kapacitás javításával a gyermek egyrészt képességeinek megfelelő teljesítményt tud nyújtani, másrészt a hiperaktív/impulzív tünetek mérséklésével a szociális beilleszkedése is könnyebbé válik.

2.2. Genetikai meghatározottság az ADHD vonatkozásában

A molekuláris genetikai vizsgálatokat minden esetben család- és ikervizsgálatok előzik meg, melyek segítségével felmérhető, hogy milyen mértékű a genetikai faktorok szerepe az egyes betegségek kialakulásában. Családvizsgálatok során meghatározzák, hogy milyen az adott betegség előfordulása a családtagok körében, és ez hogyan aránylik az átlag populációban megfigyelhető gyakorisághoz; ez az arány adja a relatív rizikófaktort. Ikervizsgálatok során az egy- illetve kétpetéjű ikrek konkordanciáját összehasonlítva állapítható meg az örökölhetőség, melynek értékét a szakirodalomban egyaránt 0-1 skálán, illetve százalékos formában adhatják meg (*Gervai 2009*).

Az ADHD genetikai meghatározottságát családfák vizsgálata alapján évtizedek óta felismerték, örökölhetőségét ikervizsgálatok alapján 65-80%-ra becsülik (*Faraone és mtsai 2015*). Az 1990-es években nagycsaládok genetikai analízise során az is nyilvánvalóvá vált, hogy nem egyetlen gén, hanem feltehetően több gén együttes hatása, illetve környezeti faktorokkal való interakciója vezet a pszichés zavar kialakulásához. Hasonlóan más multifaktoriális, komplex öröklésmenetű betegségekhez, az ADHD-ban is feltehetőleg több (egyenként kis hatású) rizikó, avagy érzékenyítő genetikai variáns együttes jelenléte szükséges a tünetek kialakulásához, ezért is próbált sok genetikai kutatás specifikus rizikófaktorokat azonosítani e kórkép hátterében az utóbbi évtizedekben (*Faraone és Larsson 2019*).

Rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az ADHD etiológiájában a környezeti és a genetikai faktorok egyaránt fontosak. A környezeti tényezők közül egyelőre olyan, nem speciális faktoroknak bizonyított a szerepe, melyek sok más gyermekkori betegségben, illetve gyermekpszichiátriai kórképekben is szerepet játszanak. Ilyen például a perinatális distressz (terhesség során fellépő toxaemia, eclampsia, anyai betegség, illetve drog- vagy alkoholfogyasztás, valamint szülés alatti komplikációk), pszichoszociális rizikófaktorok (családi konfliktus, egyedül nevelő szülő, a nevelő pszichés zavara), és az alacsony szocio-ökonómiai státusz (*Palladino és mtsai 2019, Thapar és mtsai 2013, Faraone és mtsai 2015*). A környezeti faktorok közül kiemelendő még az anyától való nagyon korai elszakadás, illetve elhanyagolás, valamint a gyermekkori traumás életesemények, stressz szituációk (*Harold és mtsai 2013, Banaschewski és mtsai 2017, Sellers és mtsai 2019*).

A poligénes öröklésment vizsgálatának jelenleg két fő irányvonala van: előzetes hipotézisek alapján kiválasztott kandidáns gének elemzése és a hipotézismentes genom-szintű asszociáció vizsgálatok (GWAS: genome-wide association studies). A DNS-chipek technikai fejlődésével ugyanis lehetővé vált többszáz ezer polimorfizmus mérése, ami valamennyi jelenleg ismert humán gén egyidejű elemzésére ad lehetőséget. Ezek a mérések átlagosan 200-500 ng genomi DNS-ből történnek, de akár az újszülöttkori szűréskor levett, Guthrie-kártyán szárított vérmintából is kivitelezhetők. Ma már a pszichiátriai zavaroknál is elterjedten alkalmazzák a poligénes rizikópontszám módszert (PRS: Polygenic Risk Score), amely a kis hatású genetikai rizikó variánsok hatását összesíti, így a genetikai kockázat jobban elemezhető, mint az egyedi variánsok külön-külön vizsgálatával (*Réthelyi és mtsai 2019*). A genom-szintű vizsgálatok hátránya, hogy ezek az asszociáció vizsgálatok ritkán érik el a genom-szintű statisztikai szignifikancia értéket ($LOD < 2$, LOD: logarithm of the odds), és így sokszor különböző országokban végzett elemzések összegzése, legalább tízezer beteg és kontroll személy adata szükséges a kis genetikai hatások kimutatására.

A legelső genom-szintű ADHD kutatások próbáltak homogénebb betegcsoportokra, mint például a gyermekkori kombinált ADHD típusra koncentrálni, azonban így nemzetközi összefogással is csak 700-900 ADHD-s gyermek adatait tudták egy-egy vizsgálatban elemezni. Ezek a GWAS eredmények csak valószínűsíthető kapcsoltságról ($LOD > 2$) számoltak be az egyenként feltehetően kis rizikójú genetikai variánsokról (*Neale és mtsai 2010*). Ezért az esetszám növelése érdekében a genetikai kutatásban dolgozók konzorciumokat hoznak létre és metaanalízisek segítségével érik el a megfelelő statisztikai erőt. Például, egy nemzetközi összefogás keretében 12 GWAS kohorsz összevonásával, 20 183 ADHD-s beteg és 35 190 kontroll személy vizsgálatával tudtak végül genom-szinten szignifikáns rizikó allélokat azonosítani (*Demontis és mtsai 2019*). Eredményeiket független, átlagpopulációt elemző GWAS adatokkal is összehasonlították, ugyanis az ADHD sok más zavarral mutat átfedést, úgymint depresszióval, alvászavarral, elhízással és dohányzással. Fontos kiemelni, hogy az ADHD rizikó génvariánsok ezekkel az egészségügyi és pszichés zavarokkal is asszociációt mutattak a független GWAS kohorszokban, csakúgy, mint az ADHD-s betegekre jellemző alacsonyabb iskolai végzettséggel, illetve a korai gyermekvállalással és halálozással. A legtöbb ilyen átfedő génvariáns az agy fejlődésében és jelátviteli

folyamataiban játszik szerepet, mint például a szinapszis érésében fontos FOXP2 (forkhead box P2) transzkripciós faktor, a neuronok beidegzését segítő SEMA6D (semaphorin 6), avagy a szinaptikus dopaminszintet befolyásoló DUSP6 (dual specificity phosphatase 6). Érdekes megemlíteni, hogy az ADHD diagnózisával legerőteljesebb asszociációt mutató ($p \sim 10^{-13}$) kromoszómaszakaszon található többek között a neurotransmitter transzporter SLC6A9 (Solute Carrier Family 6 Member 9) génje is, ami a gátló glicin jelátvivő molekula szinapsziszból való eltávolítását végzi.

Mivel gyermekkorban az ADHD sokszor társul más kórképekkel, úgymint magatartászavarok, hangulatzavarok (szorongás, depresszió), illetve tik zavarok (*Melegari és mtsai 2018, Cuffe és mtsai 2020*), diagnosztikus kategóriákon átívelő elemzéseket is sokan végeznek. Például Zhao és Nyholt (2017) öt betegségcsoport (ADHD, szkizofrénia, major depresszió, bipoláris zavar és autizmus spektrum zavar) GWAS elemzésekor 33 332 beteg és 27 888 kontroll személy adatait vetette össze, így 36 gén esetében talált szignifikáns összefüggést mind az öt betegséggel. A Psychiatric Genomics Consortium (PGC) legújabb elemzésében 232 964 beteg és 494 162 kontroll személy adatait dolgozták fel (*Cross-Disorder Group of the PGC 2019*). Nyolcféle betegséggel diagnosztizált betegcsoportot vizsgáltak: ADHD, anorexia nervosa, autizmus spektrum zavar, bipoláris zavar, major depresszió, obszesszív-kompulzív zavar, szkizofrénia és Tourette-szindróma. A metaanalízisük eredménye alapján 109 génlókuszt legalább két pszichiátriai zavarral van összefüggésben, és 23 lókusznak volt négy vagy több betegségre pleiotróp hatása. Egy újabb tanulmányban (*Akingbuwa és mtsai 2020*) 42 998 beteg bevonásával végeztek metaanalízist, ahol a felnőttkori major depresszió és a gyermekkori pszichiátriai zavarok (többek között ADHD) között találtak összefüggést.

Sokféle adattal szolgálhatnak az átlagpopulációkat elemző adatbázisok is, hiszen az ADHD magtünetei spektrumszerű jellegűek, mindenki elhelyezhető ezek tengelyén. Például, *Middeldorp és mtsai (2016)* átlagpopulációból származó 17 666 gyerek mintájának metaanalízisét végezték el, hogy az ADHD genetikai hátterében fontos gyakori génvariánsok szerepét bizonyítsák. A metaanalízisük ugyan nem eredményezett genom-szinten szignifikáns asszociációt egyik vizsgált SNP-vel sem, de a génalapú elemzésük egy idegfejlődésben fontos gén, a WASL (Wiskott-Aldrich syndrome protein like actin nucleation promoting factor) szerepére hívta fel a figyelmet az ADHD-s

tünetek kialakulásában. A nagy elemszámú átlagpopulációs adatbázisok, mint például a UK Biobank vagy a dán iPSYCH konzorcium mintái, mára már százezres elemszámmal duzzadtak, amik remélhetőleg a kis(ebb) hatású genetikai változatok detektálását is lehetővé teszik (*Leppert és mtsai 2020, Bybjerg-Grauholm és mtsai 2021*). Az továbbra is kérdés, hogy a jelenlegi GWAS eredmények hány százalékban nyújtanak magyarázatot az ADHD genetikai hátterére, ugyanis a gyakori SNP-k vizsgálatával mérhető örökölhetőség 20% körüli (Middeldorp és mtsai átlagpopulációs adataik alapján az ADHD tünetek SNP-heritabilitása 5-34%, míg a PGC eset-kontroll elemzése alapján az ADHD-diagnózisé 10-28%). Ezért a „hiányzó” heritabilitás felkutatására ma sokféle irányzat létezik, mint például a ritka genetikai variánsok analízise, illetve epigenetikai változatok mérése (*Manolio és mtsai 2009*), ezekre dolgozatomban részletesen nem térek ki. Hangsúlyoznám viszont a fenotípus finomításra való törekvést, az objektív, illetve kvantitatív mérőeszközökkel kapott skálák használatát az asszociáció elemzésekben. Mivel a részletesebb fenotípus felvétele általában kisebb elemszámú mintákon kivitelezhető, a kandidáns gének vizsgálata továbbra is folyik, ugyanis a többszörös tesztelés alacsonyabb száma miatt ennek a statisztikai ereje még kisebb elemszám esetén is általában nagyobb, mint a genom-szintű asszociáció vizsgálatoknak. A GWAS vizsgálatok árának csökkenésével, az SNP vizsgálatok terén valószínűleg háttérbe szorulnak a kandidáns gén vizsgálatok, de a hosszúság polimorfizmusok (VNTR) vonalán feltehetően megmaradnak az a priori teóriák által kiválogatott kandidáns gén vizsgálatok.

2.3. Kandidáns gén vizsgálatok figyelemhiányos/hiperaktivitás zavarban

Az ADHD 70% körüli örökölhetőségének hátterében számos kandidáns génvizsgálat próbált specifikus rizikófaktorokat azonosítani. Ilyenkor irodalmi és elméleti alapon választunk ki egy-egy polimorf gént vagy géncsaládot, és vizsgáljuk, hogy kimutatható-e az egyes allélek hatása a kiválasztott jelleg vagy kórkép kialakulásában. ADHD-ban a figyelem leginkább a dopaminerg rendszer génjeire irányult, a gyógyszeres kezelésben használt metilfenidát dopamin transzporter gátló hatása miatt. A metaanalízisek során 1,2 körüli esélyhányados (OR: odds ratio) értékeket kaptak az ADHD diagnózisra a dopamin transzporter, valamint a D4 és D5 dopamin receptor gének (DRD4 és DRD5) hosszúság polimorfizmusai esetén (*Gizer és mtsai 2009*). Hasonlóan kicsi, de

szignifikáns hatását igazolták a szerotonin transzporter (SLC6A4), a szerotonin 1B receptor és a SNAP25 (szinaptoszóma-asszociált fehérje, 25 kDa) gén polimorfizmusainak az ADHD patogenezisében.

Fontos megjegyezni, hogy az előzetesen azonosított dopaminerg és szerotonerg kandidáns gének nem mutattak erőteljes asszociációt a GWAS adatoknál. Ennek lehetséges okaként az alacsony esetszámot valószínűsítik. Alternatív magyarázatként szolgálhat a heterogén mintavétel (a különböző országokban fennálló eltérő betegbeválasztási gyakorlat, illetve esetlegesen eltérő környezeti hatások), valamint a gén- és a gén-környezet interakciók befolyásoló hatása. Példaként említeném, hogy az eddigi gén-környezet kölcsönhatások vizsgálatai asszociációt írtak le a dopamin és szerotonin transzporter gének rizikófaktorként azonosított genotípusai, valamint a terhesség alatti dohányzás és alkoholfogyasztás, illetve a csecsemőkori pszichoszociális ártalmak között, azonban független kutatások eredményei ezeket nem minden esetben erősítették meg (*Wermter és mtsai 2010, Assary és mtsai 2018, Wang és mtsai 2019*).

Mivel a kis hatású genetikai faktorok azonosítása nehéz, nagyon fontos a genetikai asszociációk replikációja független beteg populációkban. A gyermekkori pszichiátriai zavarok genetikai vizsgálatainak előnye, hogy a biológiai szülők elérhetősége miatt családi triókat tudnak vizsgálni az eset-kontroll elemzések helyett vagy azok kiegészítéseképpen, elkerülve a populáció rétegződése által okozott esetleges torzításokat, hamis asszociációkat.

Dolgozatomban a NET neurotranszmitter transzporter, illetve az ADHD gyógyszeres kezelésében használt metilfenidát lebontásért felelős CES1 enzim génvariánsainak elemzését mutatom be. A következő alfejezetekben e kandidáns gének vizsgálatához szükséges, a kutatási hipotéziseinket megalapozó szakirodalmi ismereteket járom körbe.

2.4. Az ADHD neurobiológiai háttere

Az emberi agyban a prefrontális kéreg (PFC: prefrontal cortex) a legkésőbb kialakult struktúra evolúciós és egyedfejlődési szinten egyaránt. A PFC érésének, neuronális kapcsolatainak kialakulása döntő része gyerekkorban zajlik, amit a fehérállomány fokozatos növekedése is mutat, ezzel párhuzamosan fejlődnek a kognitív funkciók. A PFC alapvetően a magasabb rendű célirányos viselkedés megtervezését és kivitelezését határozza meg, amit érzelmi aspektusok is befolyásolnak. Mágneses magrezonancia képalkotó eljárásokkal (MRI: Magnetic Resonance Imaging) kapott eredmények

igazolták több gyermekpszichiátriai zavar, többek között az ADHD esetében is a bazális ganglionok (BG, törzsdúcok) érintettségét. ADHD-s gyerekek és serdülők strukturális MRI vizsgálatai csökkent BG (pontosabban a jobb globus pallidus, jobb putamen és nucleus caudatus) térfogatot mutatnak, és az eredeti nucleus caudatus aszimmetria (jobb oldali nagyobb, mint a bal) csökkent (*Frodl és Skokauskas 2012, Paclt és mtsai 2016, Gehricke és mtsai 2017*).

Fontos megjegyezni, hogy egy nemzetközi összefogásban létrejött megalanálízis nagy elemszámú, klinikai és populációs minták MRI adatai alapján kis mértékű felszíncsökkenést írt le ADHD-s gyerekek frontális, cinguláris és temporális kérgi régióiban, azonban ezek a strukturális eltérések serdülőkorú betegeknél már eltűntek (ENIGMA-ADHD minta 4–14 éves korcsoportjában 1081 ADHD-s beteg és 1048 kontroll, 15–21 éves korosztályban 432 beteg és 347 kontroll, 22 év feletti csoportjában 733 beteg és 539 kontroll MRI adatát elemezték, *Hoogman és mtsai 2019*). Ezeknél a strukturális elváltozásoknál örökletes faktorok szerepét is ki tudták mutatni két európai centrum családatai alapján, 211 ADHD-s beteg és 175 tünetmentes testvérének 120 egészséges kontroll gyerek MRI adataihoz viszonyítva. A testvérek adatai alapján a teljes felszíni terület, a gyrus frontalis superior és medius, valamint a laterális orbitofrontális gyrus csökkent felszínét azonosították, mint ADHD vonatkozású endofenotípus (*Hoogman és mtsai 2019*). Az ADHD-s gyermekek homloklebenyében megfigyelt strukturális elváltozások alátámasztják a klasszikus neurobiológiai elméleteket, melyek a fronto-striatalis körök funkciózavarát tételezik fel.

Az ADHD tüneteinek magyarázatául szolgáló szabályozó köröket a 3. sz. mellékletben tüntettem fel (*Nemoda és Tárnok 2009* alapján). A frontális lebenynek öt fő feldolgozóköre van, amelyek a bazális ganglionok különböző magjain keresztül kapcsolnak át (*Weiner 1997, Fuster 1999*). A vázizmok mozgását koordináló motoros kör, illetve a szemmozgásokat végző okulomotoros kör a motoros kéreg speciális területeiről indulnak. A kognitív folyamatok és a viselkedés szervezésében a dorsolaterális és orbitofrontális prefrontális körök a meghatározóak, míg az érzelmek és motiváció szabályozásában a mediális-ventrális prefrontális kör a legfontosabb, amely a limbikus rendszer tagjait (pl. a nucleus accumbens) is érinti. A bazális ganglionoknak fontos szabályozó szerepük van, hiszen a frontális lebeny feldolgozó körei itt

kapcsolnak át, és a BG szinten mindegyik feldolgozóköron belül van egy serkentő (excitátoros) ún. direkt pálya, és egy gátló (inhibitoros) ún. indirekt pálya.

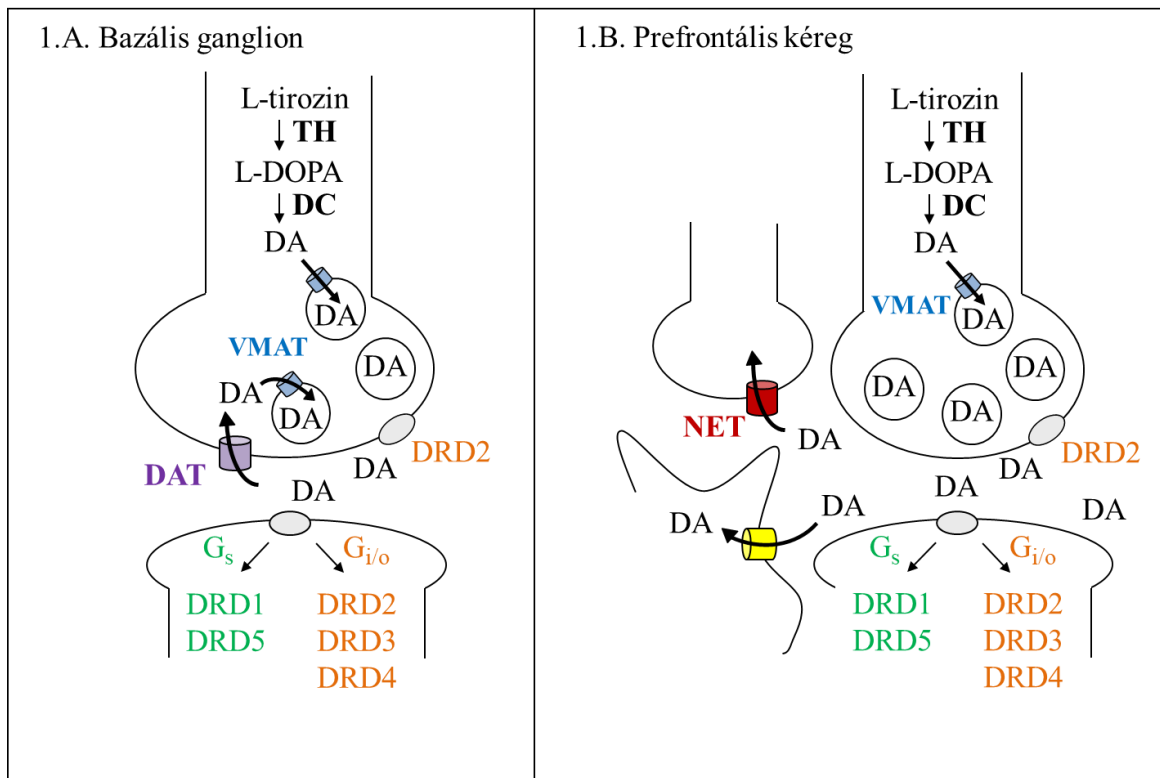
A cselekvés tervezése és elindítása tehát a frontális kéregben történik, a BG szinten csupán erősítés, illetve gátlás jön létre: a direkt pályarendszereken keresztül az adott szituációban kívánatos viselkedésformák erősödnek, míg az indirekt pályarendszereken keresztül a nemkívánatos, konkuráló cselekvések gátlódnak. Normál működés esetén az adott szituációban kívánatos viselkedésformák kerülnek erősítésre, míg a nemkívánatos viselkedésformák gátlásra (pl. a tanár beszédére figyel és nem az ablakban megjelenő pillangóra). Mind a kérgi és a kéreg alatti struktúrák monoaminerg beidegzése fontos moduláló tényező ezekben a folyamatokban, amit mutat a katekolaminok (dopamin és noradrenalin) optimalizáló hatása a PFC-be beérkező információk szűrésében és fenntartásában, avagy a jutalmazási/büntetési (reward) rendszerben, illetve a szerotonin hatása a limbikus rendszerhez köthető emocionális folyamatokban (4. sz. melléklet).

A neurobiológiai elméletek sokszor fenotípusosan különböző pszichés zavarokat sorolnak egy csoportba, ha hasonló agyi folyamatok diszfunkcióját vélik fellelni a különféle tünetek hátterében. Például az ADHD-ra és a vele gyakran együttesen megjelenő tik zavarokra is jellemző a helytelen, szituációnak nem megfelelő gondolatok és cselekvések gátlásának képtelensége (*Casey, Durston és Fossella 2001*). Az ADHD tünetei között szerepel az adott feladat megoldásához szükséges aktivitás fenntartásának nehézsége, könnyen elterelhető figyelem, impulzív cselekvések, melyek egy alulműködő direkt BG pálya eredményeként is értelmezhetők. Másrészt az alulműködő frontális végrehajtó funkciók az összetettebb cselekvések célirányos kivitelezésének zavarához vezethetnek.

Összefoglalva elmondható, hogy az ADHD neurobiológiai eredetét agyi képkalkotó (főleg MRI) eljárásokkal kapott eredmények támasztják alá. Megfigyelhető a féltekék közötti normál aszimmetria fejlődési zavarokra jellemző eltűnése, leginkább a BG szintjén. Funkcionális képkalkotó fMRI, illetve pozitron emissziós tomográfia vizsgálatok csökkent aktivitást írtak le ADHD-ban a jobb oldali PFC és a striatum területén (*Krain és Castellanos 2006*). A korcsoporti átlaghoz képest lassabb ütemben való agyfejlődés vezethet ezekhez az idegfejlődési zavarokhoz, hiszen az ADHD tünetei nagymértékben csökkenhetnek az életkor előrehaladtával (a gyerek úgymond „kinövi” e zavarokat).

2.5. A katekolamin rendszerek és polimorfizmusaik

A monoamin típusú neurotranszmitterek aminosavak hidroxilálása és dekarboxilálása során jönnek létre. Tirozínból alakul ki a dopamin (DA), illetve a noradrenerg neuronokban a dopamin-béta-hidroxiláz által a noradrenalin (NA), ezt a két jelátvivő molekulát együttesen ezért katekolaminnak hívjuk (a DA szintézis lépéseit lásd az 1. ábrán).



1. ábra. A dopaminerg szinapszis a nucleus caudatusban (1. A.) és a prefrontális kéregben (1. B.) (Nemoda és mtsai 2011 alapján).

A dopamin szintézise két lépésben történik: az L-tirozin aminosavat a tirozin-hidroxiláz (TH) átalakítja L-dihidroxi-fenil-alaninná (L-DOPA), amelyet ezután az aromás aminosav-dekarboxiláz (DC) alakít dopaminná (DA). Az axon végén a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT, kék színnel jelölve) veszi fel a DA-t, ami az akciós potenciál érkezéséig vezikulákban tárolódik. Az akciós potenciál a vezikulák exocitózisát váltja ki, és a neurotranszmitter a posztszinaptikus receptorokon hatva fejti ki hatását. A kétfajta receptor család a G-fehérje aktiválódásuk alapján vannak felsorolva: a D1-típusú DRD1 és DRD5 aktiválja, míg a D2- típusú DRD2, DRD3 és DRD4 gátolja az adenilát-cikláz.

1. A: A szinaptikus DA hatását a bazális ganglionban a dopamin transzporter (DAT, lila szín) függeszti fel azáltal, hogy visszaveszi a dopamint a preszinaptikus neuronba. A visszavett DA nagy része újra felhasználásra kerül, vezikulákban tárolva.

1. B: A prefrontális kéregben a DAT mennyisége kevés, viszont a noradrenalin transzporter (NET, vörös szín) mennyisége jelentős, mely a dopamin felvételére is képes. A kortikális gliasejtek is résztvesznek az extracelluláris monoaminok eltávolításában (organikus kation transzporterrel, sárga szín).

A DA felszabadulását preszinaptikus DRD2 (vagy DRD3) receptorok szabályozzák. A bazális ganglionokban, mint a nucleus caudatusban is, a neurotransmisszió a dopamin transzporterén (DAT, SLC6A3) keresztül szabályozódik, amely hatékonyan visszaveszi a DA-t a preszinaptikus idegsejtbe (1. A. ábra). A prefrontális kéregben a jelátvitel lecsengése kissé más a DAT hiánya miatt (1. B. ábra). A kérgi területeken a DA molekulát egyrészt noradrenerg neuronok, másrészt gliasejtek veszik fel aktív transzport segítségével (1. B. ábra *Nemoda és mtsai 2011* alapján). Érdekes megemlíteni, hogy kortikális asztrocitákban megfigyelt extraneurális monoamin transzporter (SLC22A3, organikus kation transzporter 3) és a vezikuláris monoamin transzporter (VMAT2, SLC18A2) együttese jelentősen befolyásolja a dopamin homeosztázist (*Petrelli és mtsai 2020*).

Az idegsejtek közötti jelátvitel nagysága alapvetően függ a felszabaduló jelátvivő molekula mennyiségétől, a szinapszisban létrejövő koncentrációjától, az ott eltöltött időtől, illetve a posztszinaptikus neuron membránjában lévő receptorok mennyiségétől és minőségétől. Normál működés esetén egy gyorsan létrejövő, nagymértékű neurotransmitter felszabadulás adja a jelet, amely gyorsan lecseng egy aktív visszavételt végző transzporter, vagy egy lebontó enzim segítségével, hogy az alap állapot helyreállása után minél előbb teret adjon a következő, új impulzusnak. Ha ez nem történik meg és túl sokáig marad a szinapszisban a neurotransmitter, akkor másodlagos, kompenzáló folyamatok indulhatnak be: csökkenhet a posztszinaptikus receptor érzékenysége vagy sűrűsége, a preszinaptikus autoreceptorokon keresztüli visszacsatolás révén pedig változhat az idegingerület intenzitása. A megváltozott ingerület intenzitása, mind az alul-, mind a túlműködés (hipo- és hiperfunkció) pszichés zavarokhoz vezethet (*Nemoda és Tárnok 2009*).

A frontális lebeny kognitív funkcióira mindkét katekolamin (DA és NA) koncentrációja fordított U-alakú hatással van: stressz-helyzetben túl sok, monoton szituációban vagy álmós állapotban pedig túl kevés moduláló neurotransmitter szabadul fel a PFC-ben, mindkét esetben funkcióromláshoz vezetve (*Arnsten és Rubia 2012*). Fontos megjegyezni, hogy a két katekolamin típusú neurotransmitter molekulárisan csupán

egy hidroxil-csoportban tér el, így a nagyfokú szerkezeti hasonlóság néhol lehetővé teszi a kereszt-aktiválást: például a NA stimulálhat dopamin receptorokat (a DRD4 receptorhoz nagyfokú affinitása van) (*Newman-Tancredi és mtsai 1997*), illetve a NET részt vehet a dopamin visszavételében (*Moron és mtsai 2002*).

A dopaminerg rendszerek közül a mozgás-koordinációban fontos nigrostriatalis pálya, az érzelmi élet, az ösztönös magatartások és motiváció kialakításában résztvevő mesolimbicus pálya, valamint a figyelem és egyéb kognitív folyamatok szervezésében jelentős mesocorticalis pálya egyaránt jelentőséggel bír a pszichiátriai kórképek neurobiológiai elméleteiben (4. sz. melléklet). Emiatt sok pszichiátriai genetikai asszociáció vizsgálatban dopaminerg polimorfizmusokkal találkozhatunk. Leginkább azokat a génvariánsokat vizsgálják, amelyekről feltételezhető, vagy esetleg már bizonyított, hogy funkcionális hatással rendelkeznek, például egy receptor vagy transzporter szintjét változtatják meg.

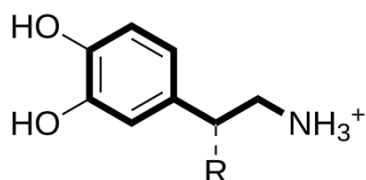
A dopaminerg rendszerek hosszantartó érése gyermekkorban magyarázhatja az ADHD tüneteinek csökkenését serdülőkor után, ugyanis a thalamocorticalis gátló körök fontos szabályozó rendszere a bazális ganglionok szintjén a DA. A DAT sűrűsége itt a legnagyobb az agyban (*Volkow és mtsai 1998, Arnsten és Rubia 2012*). A subcorticalis régiókban hatékonyan fejeződik be a DA neurotranszmisszió, amikor a DAT visszaveszi a DA-t a szinapsziszból a preszinaptikus neuronba (1. A. ábra). A prefrontális kéregben azonban a DAT mennyisége alacsony, viszont a NET mennyisége jelentős (1. B. ábra). Ennek azért van nagy jelentősége, mert az ADHD kezelésében széles körben alkalmazott metilfenidát (MPH) a katekolaminok visszavételének hatékony blokkolója, mind a DAT-t, mind a NET-t gátolja.

2.6. Az ADHD farmakoterápiája

Az idegrendszerre ható szerek hatása alapvetően kétféle lehet: megkülönböztetünk azonnali hatást (pl. a pszichostimulánsok transzporter gátlása), illetve másodlagos vagy harmadlagos neurokémiai változások során létrejövő terápiás hatásokat, amikor a gyógyszer tünetcsökkentő hatásához többnyire 6-8 hét szükséges (pl. a szelektív szerotonin transzporter gátlóknál). Ezutóbbi esetben a gyógyszer idegrendszeri hatása sokkal komplexebb, pl. a transzporter gátlás révén megnövekedett neurotranszmitter szint a receptorok sűrűségét változtatja meg, vagy más – néha fontosabb – útvonalakat

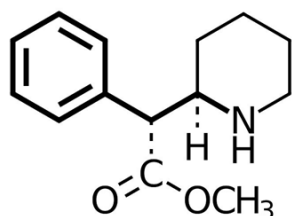
is beindít, amint azt nemrégiben bizonyították az antidepresszív szerek neurotrofin receptorokat érintő hatásmechanizmusánál (*Casarotto és mtsai 2021*).

Magyarországon jelenleg két gyógyszer került engedélyezésre az ADHD kezelésében: a stimuláns típusú metilfenidát (Ritalin, melynek van hagyományos és nyújtott hatású készítménye), valamint a nem-stimuláns típusú atomoxetin (Strattera illetve Bitinex). Az MPH-nak mind a DAT, mind a NET szubsztrátja, ugyanis az MPH fenolgyűrűje hasonló szerkezetű, mint a katekolamin típusú DA és NA neurotranszmitter (*Markowitz és mtsai 2006*) (2. ábra), viszont az atomoxetin szelektív NET gátló. A két gyógyszer között sok hasonlóság van, mind hatékonyságban, mind a mellékhatások tekintetében (*Cortese és mtsai 2018*), ennek ellenére néhány esetben csak az egyik, vagy másik gyógyszer hatékony, vagy tolerálható egyes betegeknél (*Myer és mtsai 2018*).

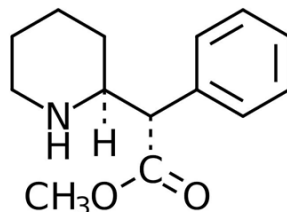


Dopamin: R=H

Noradrenalin: R=OH



D-treo-metilfenidát



L-treo-metilfenidát

2. ábra: A metilfenidát kémiai szerkezete (*Markowitz és mtsai 2003* nyomán).

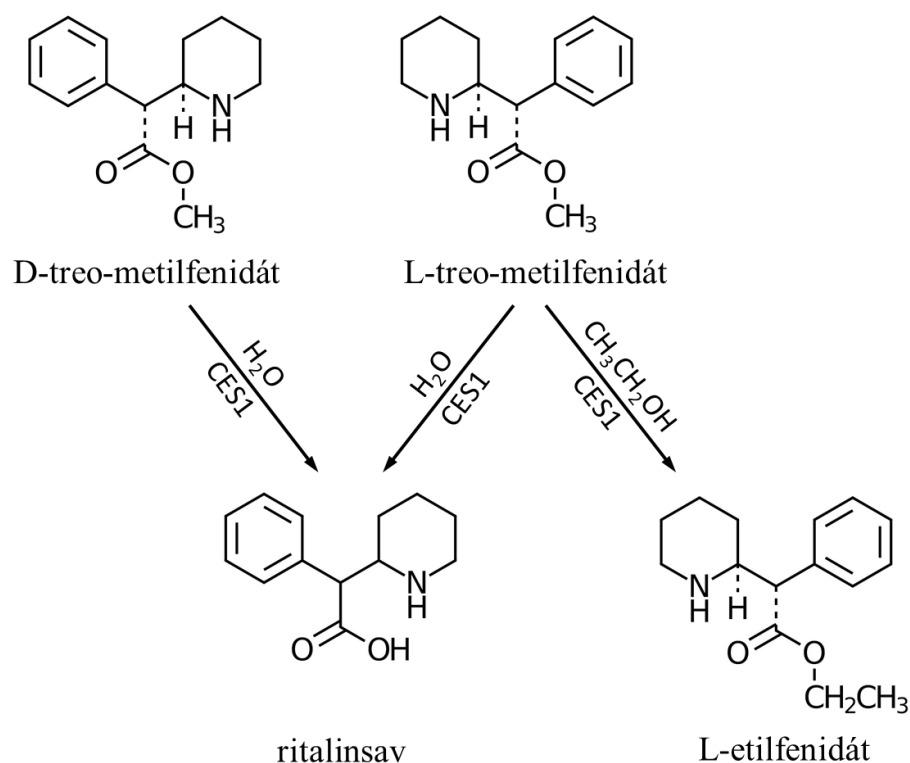
A D-treo-metilfenidát szerkezeti képlete (a metilfenidát fenolgyűrűje és a központi része) hasonló szerkezetű, mint a dopamin és a noradrenalin.

Magyarországon az MPH az elsőnek választandó szer az ADHD gyógyszeres terápiájában (*Pászthy és mtsai 2020*, 5. sz. melléklet), mely az esetek 65-70%-ában hatékony (*Biederman és Spencer 2008*). Emellett fontos megjegyezni, hogy ritkán, súlyos mellékhatások is előfordulnak, a gyerekek kb. 3%-ánál jelentkezhetnek tik zavarok, megnyúlt QT idő, depresszió, pszichózis és/vagy mánia tünetek (*Myer és mtsai 2018*). A pszichostimulánsok gyakori mellékhatása az alvászavar. MPH terápia során

ezen kívül jelentkezhethet idegesség, levert hangulat, étvágycsökkenés, ritka mellékhatás a hasfájás, hányinger, szédülés, fejfájás, súlycsökkenés, vérnyomásváltozás. Kiemelendő, hogy az MPH terápiánál megnövekedhet a gyógyszerabúzus kockázata (ez kisebb mértékű kockázat a hosszú hatású készítményeknél).

Komorbid szorongásos vagy depresszív tünetek, tik zavar, vagy oppozíciós magatartászavar jelenléte esetén az atomoxetin választandó, mert az a komorbid tünetek súlyosságát is csökkenti (*Pászthy és mtsai 2020*). Az atomoxetin mellékhatása között említik az étvágy csökkenését, hányingert, dyspepsiát, szédülést, szedációt, a hangulati ingadozást, a növekedés elmaradását (*Pászthy és mtsai 2020, Warrer és mtsai 2016, Childress és mtsai 2018*). E két elsővonalbeli gyógyszer elleni kontraindikáció, mellékhatások jelentkezése, vagy egy komorbid zavar domináns jelenléte (pl. major depresszív epizód) esetén egyéb szerek is választhatók, de ezek is (részben) a katekolamin rendszereken keresztül hatnak. Jelenleg nem léteznek személyre szabott gyógyszeres kezeléshez specifikus klinikai irányelvek, bár azt már évek óta felismerték, hogy jelentős különbségek vannak ADHD betegek plazma MPH szintjeiben standard MPH adagolás mellett is.

Széleskörű felhasználása miatt az MPH molekula szerkezetét, hatásmechanizmusát és farmakokinetikai tulajdonságait intenzíven tanulmányozzák. Az MPH molekulának két királis központja van (2. ábra); ezért négy izomer létezik, a D, L-eritro-MPH pár és a D, L-treo-MPH pár. Csak a treo-MPH enantiomerek racém keverékét (D, L-treo-MPH) használják terápiásán, mert kevesebb káros mellékhatása van, mint az eritro párnak (*Markowitz és mtsai 2003*). A gyógyszerkészítményként törzskönyvezett Ritalin a D, L-treo-MPH racém keveréke.



3. ábra: A karboxilészteráz 1 (CES1) által katalizált metilfenidát lebontási folyamatok (Zhu és mtsai 2008, Patrick és mtsai 2014 nyomán).

A CES1 egy szerin-hidroláz, amely szerin-hidroxi-csoport felhasználásával acilezi a xenobiotikumok metil-észter csoportjait, majd ezt követi az etanol által katalizált acil intermedier transzészterifikáció egy úgynevezett „ping-pong” mechanizmusban.

Egy kettős vak, négyirányú randomizált, keresztezett (crossover) vizsgálatban az L-MPH nem, csak a D-MPH mutatott különbséget az emberek tartós figyelme javításában a placebóval szemben. Mivel az 5 mg D-treo-MPH figyelemjavító hatása megegyezett a 10 mg D-L-treo-MPH racém keverék hatékonyságával, a klinikai hatást az MPH D-enantiomerjének tulajdonították (Srinivas és mtsai 1992b, Sun és mtsai 2004). A Focalin (dexmetilfenidát) egy új metilfenidát készítmény, amely csak D-treo-MPH tartalmú.

Fontos említést tenni a lebontó enzimekről is, hisz ezek genetikai változatai szintén befolyásolják a gyógyszerhatékonyságot és az alkalmazott hatásos dózist. Az atomoxetinnel ellentétben, amely a máj citokróm P450 (CYP, azon belül is a CYP2D6) enzimrendszeren keresztül metabolizálódik, az MPH-t karboxilészteráz alakítja át inaktív ritalinsavvá (3. ábra). A májban termelődő karboxilészteráz 1 enzim (CES1) felelős az MPH D- és L-izomerjének (a Ritalin gyógyszer két összetevője) hidrolíziséért és az ebből adódó „first-pass” metabolizmusáért (Sun és mtsai 2004).

Az MPH metabolizmusa során farmakológiailag inaktív D- vagy L-ritalinsav képződik (*Patrick és mtsai 1987*). Számos tanulmány számolt be arról, hogy a D, L-MPH emberben sztereoselektíven metabolizálódik (*Lim és mtsai 1986, Srinivas és mtsai 1987*). Intravénás és orális alkalmazás során egyaránt a racém D, L-MPH egy sztereoselektív clearance folyamaton megy keresztül, aminek következtében a D-MPH plazmakoncentrációja magasabb lesz, mint az L-MPH (*Srinivas és mtsai 1993*).

2.7. Farmakogenetikai aspektusok

A gyógyszeres kezelés hatékonyságának a feltétele, hogy a gyógyszer aktív formája a kellő ideig jelen legyen a szervezetben ott, ahol a szükséges hatást ki kell fejtenie. Az aktív hatást egyes esetekben a primer molekula, míg máskor egy metabolit (szekunder termék) fejt ki. Ennek megfelelően a gyógyszerek átalakítását, lebontását végző enzimek tulajdonságai befolyásolják, hogy ki hogyan reagál egy adott gyógyszerre. Ha a primer molekula felelős a hatásért (mint például MPH esetében), akkor a metabolizmusért felelős enzim túlműködése hatástalanságot, alulműködése pedig toxikus koncentráció növekedést okozhat. Az ellenkezőjéhez vezethet, ha a gyógyszer metabolitja az aktív hatóanyag (mint például angiotenzin konvertáz enzim gátló pro-drugok esetében). Ilyenkor a primer molekulát lebontó enzim fokozott aktivitása a szekunder termék szintjének emelkedését eredményezi, míg alulműködése a terápiás hatás elmaradását okozhatja.

Mivel a gyógyszerek aktiválásában, transzportjában és eliminálásában közreműködő fehérjék az emberek többségében genetikai változatosságot mutatnak, a farmakogenetika eszköztárával feltérképezett egyéni genetikai profil a klinikai gyakorlat számára is releváns, személyre szabható gyógyszeres terápia lehetőségét hordozza magában. Ezáltal jobban becsülhetővé válna a terápiás válaszkészség és a megfelelő, hatás és mellékhatás szempontjából kedvező dózis meghatározása, így növelhető lenne a terápia sikeressége és csökkenthető a veszélyes mellékhatások kockázata. A farmakogenetikai vizsgálatok annak feltárására irányulnak, hogy az egyes genetikai változatok hogyan befolyásolják a gyógyszer farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságait (gyógyszeranyagcsere, hatékonyság, mellékhatások) (*Stingl és mtsai 2013*).

Az ADHD tüneteinek ismertebbé válásával, továbbá a diagnosztika finomodásával a zavar felismerése egyre hatékonyabbá vált az elmúlt években, így a pszichostimulánsok

alkalmazása is növekedett. A folyamat negatív velejárója, hogy mindez magával vonta az abúzus és a visszaélés gyakoriságának növekedését (*Shellenberg és mtsai 2020*). Ezért is fontos az MPH farmakoterápiát alacsony dózissal kezdeni, melyet csak havonta emelnek a megfelelő hatás eléréséig (nemzetközi ajánlások összefoglalását lásd Huss és mtsai 2017). A nem-stimuláns típusú gyógyszerek (pl. atomoxetin) bevezetése nagy jelentőségű volt a klinikai gyakorlatban, ennek hatékonysága az MPH-hoz hasonló (64%) az ADHD-val kezelt gyerekek körében (*Schwartz és Correll 2014*).

Fontos megjegyezni, hogy ADHD-s betegeknél a nem-gyógyszeres terápiák hatékonysága jóval kisebb mind gyerekek, mind felnőttek körében (6. sz. melléklet). Azonban az agy fejlődését potenciálisan befolyásoló gyógyszerek gyermekkori alkalmazása máig vitatott kérdés. Ezért a különböző gyógyszertípusokra adott választ előre jelző genetikai és/vagy biológiai markerek azonosítása közegészségügyi jelentőségű. A terápiában jelenleg nem lehetséges előrejelezni a gyógyszerhatékonyságot egyénre szabottan, a legtöbb kutatás még nem talált olyan genetikai vagy biológiai jellemzőket, amelyek megbízhatóan becsülni tudnák a kívánt adagolást, így az ADHD farmakoterápiája empirikus alapon működik. Jelen dolgozatban bemutatott farmakogenetikai vizsgálatok eredményei remélhetőleg hozzájárulnak olyan protokollok kialakításához, melyek egyénre szabottak lesznek, azaz egy informatív genetikai markerekből álló panel mintázatának ismeretében segítenék a klinikust a gyógyszeres terápia megválasztásában.

2.8. A noradrenalin transzporter jelentősége ADHD-ban

A gyógyszerérzékenységet meghatározó genetikai tényezőket szintén intenzíven tanulmányozták az elmúlt évtizedben, főleg az ADHD kezelés során alkalmazott MPH válasz kapcsán (*Froehlich és mtsai 2010*), mivel az ADHD-s betegeknek kb. 65-70%-a kedvezően reagál az MPH kezelésre (*Biederman és Spencer 2008*). A vizsgálatok középpontjában a dopamin és a noradrenalin transzporter génjei állnak, mert az MPH mindkét katekolamin transzporterén hat, miközben nem gátolja a szerotonin transzportert (*Gatley és mtsai 1996, Han és Gu 2006, Markowitz és mtsai 2006*). Jelentős, *in vivo* humán vizsgálati eredmény, hogy a szokásos dózisban beadott orális MPH 70-80%-osan gátolta a NET-t (*Hannestad és mtsai 2010*). Ráadásul ez a gátlás nagyobb mértékű volt az előzetesen közölt DAT gátláshoz képest (*Volkow és mtsai 1998*).

A NET polimorfizmusok genetikai asszociáció vizsgálatai ellentmondásosak voltak az ADHD-val kapcsolatban, mind az ADHD diagnózisa, mind az MPH-ra adott válasz szempontjából. Bár az ADHD-val kapcsolatos asszociáció vizsgálatok többször rámutattak a NET gén intronikus polimorfizmusainak szerepére (1. intron rs3785143 és 5. intron rs11568324) (*Brookes és mtsai 2006, Kim és mtsai 2008*), az ezzel kapcsolatos további eredmények azonban nem minden esetben voltak kongruensek (*Hawi és mtsai 2013, Tzang és mtsai 2014, Xu és mtsai 2008*).

Mivel a NET gén kódoló régiója – hasonlóan a SLC6A géncsaládba tartozó aminoszopterekhez – erősen konzervált, potenciálisan funkcionális variánsok a gén nem transzlálódó régiójában (untranslated region, UTR) helyezkednek el. A promóter régióban az rs2242446 (-182 C/T SNP) és az rs28386840 (-3081 A/T SNP) befolyásolhatja a gén transzkripció aktivitását (*Kim és mtsai 2006, Sigurdardottir és mtsai 2016, Zill és mtsai 2002*). A 3' UTR-ben eddig kevés SNP-t vizsgáltak, eddig csak a rs7194256 génexpressziót befolyásoló hatásáról számolt be egy *in vitro*, luciferáz riportter gén módszert alkalmazó tanulmány (*Marques és mtsai 2017*).

Érdemes megemlíteni, hogy a NET polimorfizmusok közül az rs11568324 SNP ritka (minor) allélja potenciálisan védő hatást fejt ki (*Kim JW és mtsai 2008*). Ennek az allélnak azonban 2% alatti a gyakorisága kaukázusi populációban, ezért kérdéses, hogy mennyire használható fel közepes-kis elemszámú vizsgálatokban. Ezzel szemben a nagyobb allélfrekvenciájú 7. intronban elhelyezkedő rs3785157, illetve a 9. exonban található rs5569 SNP-t több kutatócsoport is vizsgálta ADHD-val kapcsolatban (*Bobb és mtsai 2005, Hawi és mtsai 2013, Hohmann és mtsai 2015, Xu és mtsai 2005*).

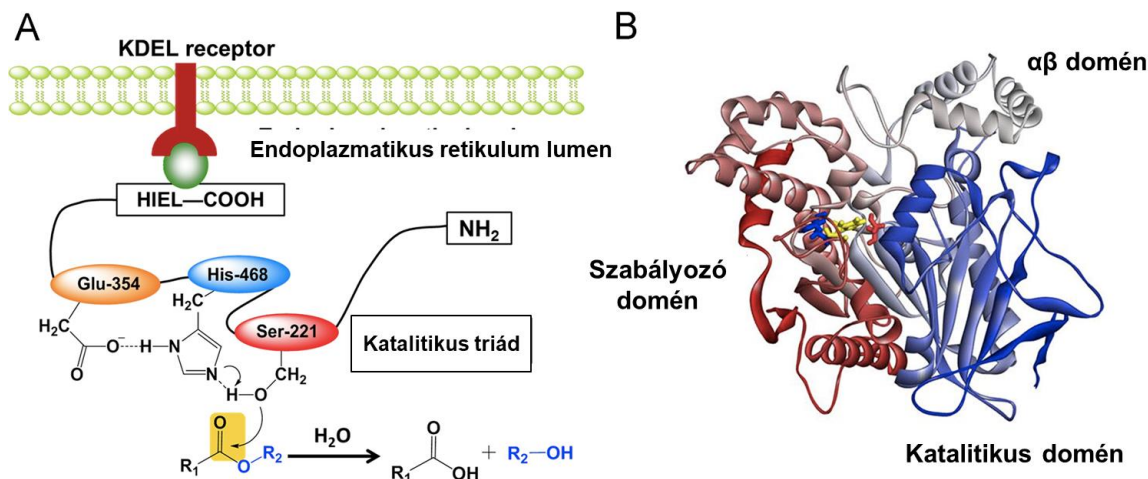
A NET genetikai variánsainak betegséggel kapcsolatos asszociáció elemzése mellett az ADHD-s betegmintákban kapott farmakogenetikai eredmények is ellentmondásosak. Az első NET farmakogenetikai vizsgálat nagyobb javulást mutatott a hiperaktivitás-impulzivitás pontszámokban (de a figyelmetlenségi pontszámokban nem) az rs5569 polimorfizmus G-allél hordozóiban, kínai Han fiatalok körében (*Yang és mtsai 2004*). Koreai ADHD-s betegcsoportokon végzett elemzések közül ezt az asszociációt két munkacsoport is alátámasztotta, miszerint a GG genotípussal rendelkezők jobban reagáltak az MPH-ra (*Park és mtsai 2012, Song és mtsai 2011*), másik két vizsgálat azonban nem talált összefüggést a NET genotípusok és az MPH hatékonysága között (*Lee és mtsai 2011, Kim és mtsai 2010*). Egy további, amerikai kettős vak, placebo-

kontrollált vizsgálat sem talált összefüggést az rs5569 és az MPH-ra adott válasz között (*McGough és mtsai 2009*). Azonban az MPH transzdermális tapasz nyílt (open-label) vizsgálatának részletes genetikai elemzése két másik, az 1. intronban található NET SNP-vel (rs17841329 és rs192303) való összefüggést talált (*Mick és mtsai 2008*). A promoter polimorfizmusokat illetően két koreai vizsgálatban jobb MPH választ találtak az rs28386840 (-3081 A/T) SNP esetében azoknál a személyeknél, akik legalább egy T alléllal rendelkeztek. Ezek közül az egyik tanulmány nagyobb mértékű javulást mutatott a Clinical Global Impression-Improvement pontszám esetében (*Kim és mtsai 2010*), a másik pedig nagyobb mértékű csökkenést talált az aktív hibázást (commission error) felmérő teszt során (*Park S. és mtsai 2012*).

Farmakogenetikai vizsgálatunk hasonló volt ezekhez az ázsiai vizsgálatokhoz, miszerint egy prospektív vizsgálatot végeztünk, a tünet súlyossági becslőskála pontszámait használva, amelyeket az MPH kezelés kezdete után havonta vizsgáltak. A széleskörben publikált NET SNP-k (úgy mint az intronikus rs3785143 és a 9. exonban található rs5569) mellett a gén 5' és 3' UTR lefedésére potenciálisan funkcionális génvariánsokat választottunk ki. Feltételeztük ugyanis, hogy ezen nem transzlálódó régiók funkcionális genetikai variánsainak nagyobb hatása lesz, mint a NET gén intronikus vagy szinonim polimorfizmusainak.

2.9. A karboxilészteráz I (CES1) szerepe a metilfenidát lebontásában

Az MPH választ vizsgáló legtöbb tanulmány a gyógyszer célpontjainak genetikai variánsaira, mint például a DAT polimorfizmusokra összpontosított (*Stein és McGough, 2008*). Számos ADHD farmakogenetikai vizsgálat azt sugallta, hogy a katekolamin rendszerek genetikai változatai befolyásolhatják az egyéni MPH válaszokat, azonban ezek az eredmények többnyire ellentmondásosak voltak. Az eddigi MPH vizsgálatok során kevés figyelmet fordítottak a gyógyszermetabolizmust befolyásoló genetikai változatokra. Az MPH-t metabolizáló CES1 (OMIM 114835) átfogó genetikai elemzésére még nem került sor, míg a CYP2D6 genetikai variánsainak metaanalízise már szignifikáns farmakogenetikai különbségeket mutatott ki az atomoxetin kezelésben (*Yu és mtsai 2016, Kim és mtsai 2018*). A humán karboxilészteráz enzimek a szerin hidrolázok csoportjába tartoznak, amelyek intracellulárisan, túlnyomórészt az endoplazmatikus retikulumot felölelő mikroszómális frakcióban találhatók meg.



4. ábra. A CES1 szerkezete és intracelluláris lokalizációja (Wang és mtsai 2018).

4. A: A CES1 fehérje ER-retenciós KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) receptor kötődéssel marad az ER-ban. A színesen kiemelt katalitikus triádot a 354-Glu (sárga), 468-His (kék) és 221-Ser (piros) aminosavak alkotják.

4. B: A CES1 három doménből áll: katalitikus (kék szín) és szabályozó domén (piros szín) mellett található az αβ domén (szürke szín). A katalitikus triádot alkotó három aminosav hasonló színekben van kiemelve az ábrán, mint a 4.A. részen.

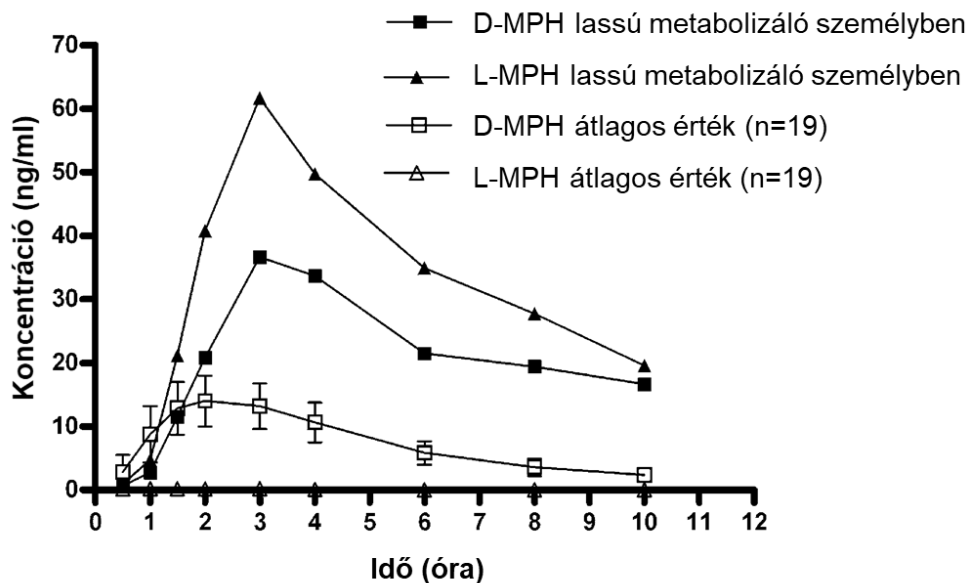
A CES1 enzim az α/β-hidrolázok csoportjába tartozik, nem transzmembrán, hanem szolubilis fehérje, a C-terminális részén található HIEL (His-Ile-Asp-Leu) motívum segítségével marad az endoplazmás retikulum (ER) lumenében (4. ábra, Wang és mtsai 2018). A CES1 röntgenkristályos szerkezete alapján tudjuk, hogy a fehérje monomerként, trimerként vagy hexamerként fordul elő (Bencharit és mtsai 2002).

A CES1 enzim a pszichostimuláns típusú MPH mellett számos más gyógyszer metabolizmusában vesz részt (pl. az ACE gátló pro-drogok aktiválásáért felelős), valamint néhány tiltott kábítószer, mint például a heroin és a kokain lebontásában játszik szerepet (Zhu és mtsai 2008). Emellett endogén folyamatokban, pl. a lipid metabolizmusban is fontosak a CES enzimek (Rasmussen és mtsai 2018). A CES1 génben található polimorfizmusok így jelentősen befolyásolhatják a gyógyszerek metabolizmusát és hatékonyságát is.

Az MPH leggyakoribb gyógyszerformája a D-treo-(R,R)- és L-treo-(S,S)-MPH racém keveréke (Ritalin), bár csak a D-izomert tekintjük aktív izomernek. Az elsődleges lebontás során mind a D-, mind az L-MPH inaktív metabolittá, ritalinsavvá alakul (Zhu és mtsai 2008, 3. ábra). Ez a CES1 által közvetített folyamat sztereoszelektív és az L-izomer hidrolízisét nagyobb affinitással végzi, ugyanis racém MPH enantioszelektív

vizsgálatai bebizonyították, hogy vérben a szabad MPH teljes koncentrációjának az L-izomer csak kis hányadát teszi ki, főleg a D-MPH izomer található a keringésben (*Sun és mtsai 2004*). Ezenkívül a D-MPH plazma felezési ideje jelentősen hosszabb, mint az L-MPH felezési ideje. Egy intravénásan beadott enantiospecifikus MPH vizsgálat szerint mindkét izomer eloszlása hasonló volt, de az L-izomer terminális eliminációs fázisa gyorsabb volt. Számos orális készítményt vizsgáló tanulmányban a két izomer plazmakoncentrációját az idő függvényében (a görbe alatti terület, area under the curve, AUC értékre nézve) hasonlították össze, és az L-MPH a D-MPH értékének kb. 1–5%-át éri csak el (példaként lásd 5. ábra, *Zhu és mtsai 2008*).

Zhu és mtsai egy randomizált, keresztezett vizsgálatban tanulmányozták a racém MPH farmakokinetikáját. A vizsgálatban résztvevők (N = 20) közül egy esetben kiugróan magas MPH értékeket detektáltak, genetikai analízisük során pedig két csökkent enzimaktivitással járó CES1 génavariánst azonosítottak ebben az összetett heterozigóta (compound heterozygote) alanyban.



5. ábra: A CES1 enzim sztereoselektív hidrolízise a D- és L-metilfenidát adásánál (*Zhu és mtsai 2008*).

Az üres háromszögek és négyzetek jelölik az átlagos értékeket, míg a fekete háromszögek és négyzetek jelölik a lassú metabolizáló D- és L-MPH plazma koncentrációját.

A lassú metabolizációval rendelkező személy egyik kromoszómáján a CES1 gén 4. exonjában a 428-as nukleotid pozícióban egy G-A csere (rs71647871) glicin-glutámát szubsztitúciót eredményez a 143-as aminosavnál (Gly143Glu), míg a másik kromoszómáján a CES1 gén 6. exonjában lévő 1 bp-os deléció (780delT) kereteltolódást (frameshift) és a fehérje idő előtti csonkolását eredményezi (Asp260fs). Megjegyezném, hogy az Asp260fs rendkívül ritka változat (Zhu és mtsai által megvizsgált 925 személy közül más nem hordozta ezt a variánst), míg a Gly143Glu polimorfizmus az eddig vizsgált populációkban 1-3%-os előfordulású (Ensembl adatbázis, <https://useast.ensembl.org/>).

2.10. A karboxilészteráz izoenzimek

A karboxilészterázok számos gyógyszer hidrolízisét végzik, a hatóanyagok észter, amid és karbamid csoportjait hidrolizálják. Hasonlóan más gyógyszer-metabolizáló géncsaládhoz, a génduplikációk során létrejött CES enzimek más-más tulajdonsággal bírnak. Az izoenzimeket kódoló gének szekvenciáinak elemzése alapján a humán karboxilészterázok egy multigén családba tartoznak. A humán CES izoenzimeket három fő családba sorolják: CES1, CES2 és CES3 (Sato és Hosokawa, 1998). A Human Genome Organization adatbázis (<https://www.genenames.org>) további két karboxilészterázt sorol fel (CES4A régebbi nevein CES6 és CES8, illetve CES5A vagy más néven CES7). Ezek a CES gének a 16-os kromoszóma hosszú karján helyezkednek el (16q12.2-ben a CES1 és CES5A, 16q22.1-ben a CES2, CES3 és CES4A, lásd 6. ábra).

chr 16 kromoszóma régiók



6. ábra A humán karboxilészteráz (CES) gének elhelyezkedése a 16q12.2 és 16q22.1 kromoszóma régiókban (NCBI adatbázisból letöltve 2021. márciusban).

Két fő izoenzimet azonosítottak az emberi májban, a CES1 enzimet (melyet CES1A1-nek is neveznek) (*Shibata és mtsai 1993, Brzezinski és mtsai 1994*) és a CES2-t (*Pindel és mtsai 1997*). A CES1A1 nagy mennyiségben, és főleg a májban (*Shibata és mtsai 1993, Brzezinski és mtsai 1994*), míg a CES2 nagyrészt a bélben, kisebb mennyiségben a májban és vesében expresszálódik (*Pindel és mtsai 1997*). Habár a CES1A1 és a CES2 tág és átfedő szubsztrát specifitással rendelkezik, igen eltérő katalitikus hatékonyságot mutatnak bizonyos szubsztrátok esetében. Például a kokain hidrolízise során a CES1A1 csak a metil-észtert, a CES2 pedig csak a benzoil-észtert hidrolizálja (*Brzezinski és mtsai 1994, Pindel és mtsai 1997*). A CES1A1 hidrolizálja az MPH metil-észter kötését is.

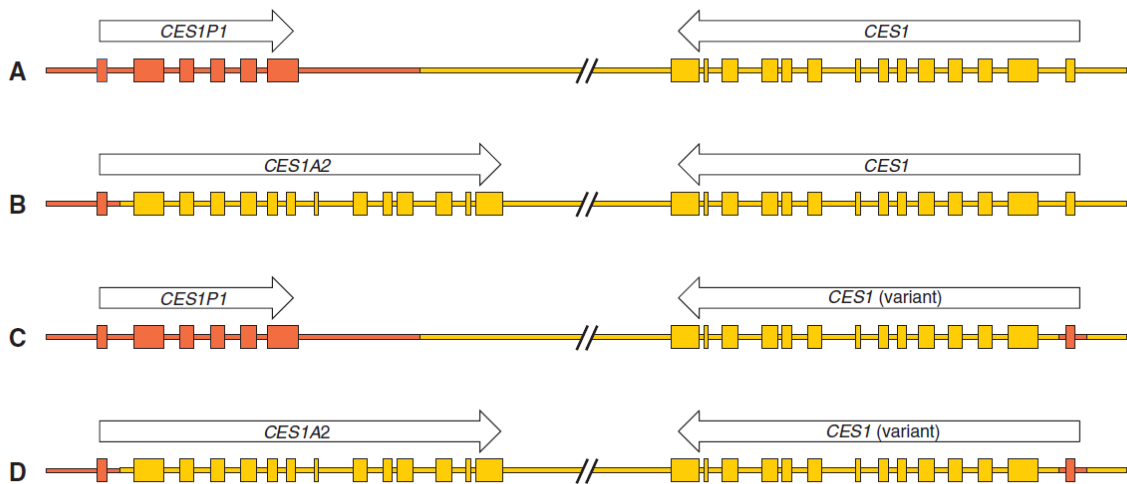
A harmadik karboxilészterázról, a CES3-ról, először a NEDO humán cDNS szekvenálásával számoltak be (gi: 7019977). A CES3 kisebb mennyiségben az emberi májban és vastagbélben expresszálódik, és feltehetően a katalitikus hatékonysága is alacsonyabb (*Sanghani és mtsai 2004*). A CES4A gén egy szekrécións aktivitással rendelkező enzimet kódol, ami kis mennyiségben az agyban, valamint a cerebrospinalis folyadékban expresszálódik. A CES5A gén szintén szekrécións tulajdonságú enzimet kódol, ami emberben nagyon alacsony mértékben expresszálódik.

2.11. A karboxilészteráz 1 gén haplotípusai

A karboxilészteráz enzimeket kódoló géneket a 16. kromoszómán azonosították. A humán kromoszómák közül a 16. kromoszómán található az egyik legtöbb szegmentálisan/részlegesen duplikált szekvencia. 2004-ben a Nature folyóiratban megjelent tanulmányban a teljes 16-os kromoszóma (78 884 754 bázispár hosszú) szekvencia elemzését közölték (*Martin és mtsai 2004*). Munkájuk során azt találták, hogy a 16-os kromoszóma 9,89%-a részlegesen duplikált, szemben a többi génnel, ahol ez az érték átlagosan 5,3%. A 16-os kromoszómán 19 blokkban találtak átfogó, nagy kiterjedésű génduplikációt, amelyek különböző géneket és génfragmenseket tartalmaznak, többek között a CES1 gént is (*Martin és mtsai 2004*).

A CES1-et kódoló gén (régábbi nevén a CES1A1) közelében két pszeudogén helyezkedik el: a CES1P1 és a CES1P2 (*Rasmussen és mtsai 2018*). Ráadásul a CES1 génnek különböző strukturális változatai fordulnak elő, ami egyes személyekben hibrid formában jelenik meg. Ilyen hibrid változat a CES1A2, ami a CES1P1 promoter és az első exon szakaszát tartalmazza (a szomszédos első intron résszel), azonban a gén

további része az aktív CES1 gén szekvenciája (lásd 7. ábra B sora), ezáltal a CES1P1 pszeudogén helyett egy aktív, de csökkent transzkripció aktivitású génváltozat van. Az aktív CES1 génnek is lehetnek variációi, például ha az első exonjának szekvenciája a CES1P1 szekvenciájával megegyező, a többi része a CES1-gyel azonos, akkor CES1A1VAR-ről beszélünk (7. ábra C sora), ezt a variánst CES1A1c-nek is nevezik. Mind a CES1A2, mind a CES1A1c kromoszómális átkereszteződés (crossing over) révén jött létre. Ezeknél a variánsoknál a promoter, az első exon és az első intron egy része a CES1P1 génből származik, csak ez a CES1A2 esetén hosszabb szakasz. Annak érdekében, hogy a különböző aktív CES1 variánsokat meg tudjuk különböztetni egymástól, a dolgozatomban a leggyakoribb, vad típusú aktív CES1 változatot CES1A1 néven jelölöm.



7. ábra: A CES1 gén A-D haplotípusai (Rasmussen és mtsai 2018).

A függőleges sávok exonokat jelölnek. A CES1-hez kapcsolódó szekvenciák sárga, a CES1P1-hez kapcsolódó szekvenciák vörös színnel vannak jelölve.

A CES1 génnek négy haplotípusa van, amik a CES1A2 és a CES1P1 jelenlétében vagy hiányában különböznek egymástól. Az A haplotípus a leggyakoribb, vad típusú: egy inaktív pszeudogén (vörös jelölés az ábra bal oldalán) és egy aktív gén (sárga jelölés az ábra jobb oldalán), míg a B és D haplotípus egyaránt két aktív gént tartalmaz (mivel CES1A2 kerül a pszeudogén helyére). Ha az aktív CES1 gén variálódik (CES1A1VAR avagy CES1A1c jelölés) akkor C, illetve D haplotípusról beszélünk.

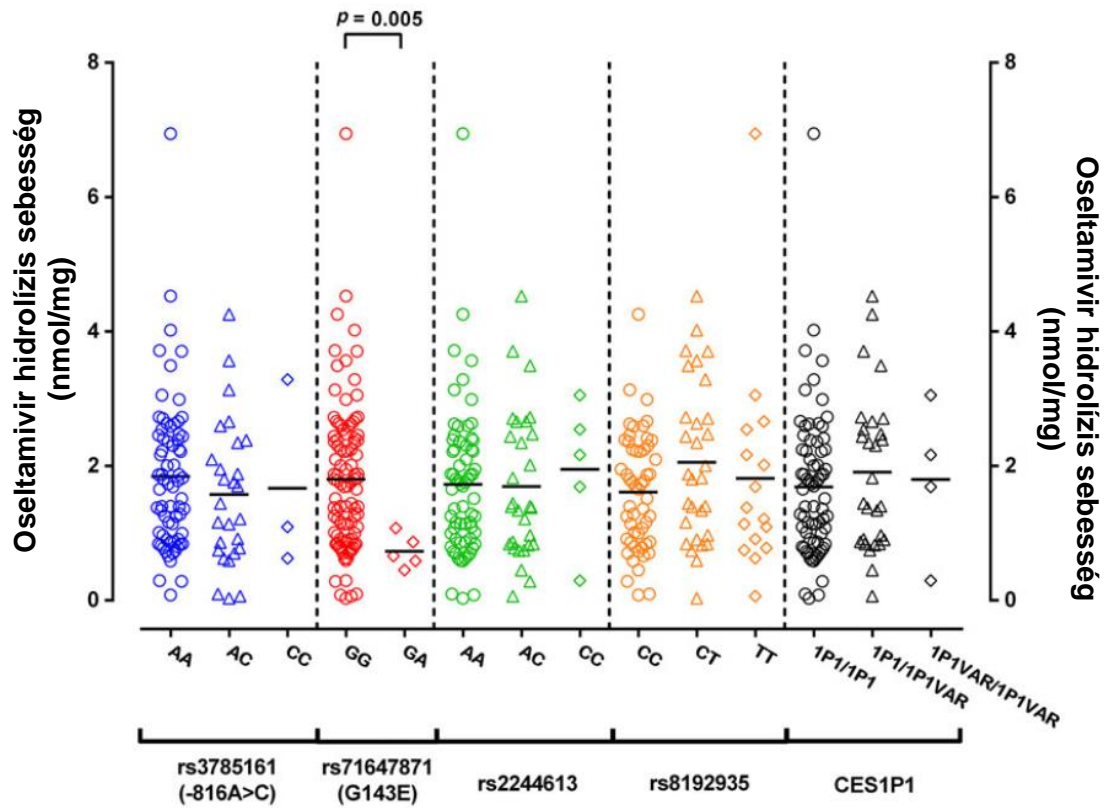
A CES1A2-nél mind a promoter, mind az első exon szakasza a pszeudogénből származik. A CES1A1VAR (CES1A1c) esetén viszont csak az első exon és a körülötte lévő intron szakaszok származnak a CES1P1 megfelelő régiójából.

Mindezek függvényében a génduplikáció miatt a CES1 gént két fő szerkezeti haplotípusba sorolhatjuk be, amelyben mindkettőnek egy CES1 másolata van (CES1A1

vagy CES1A1c), és mellette a CES1P1 vagy a CES1A2 másolata helyezkedik el. A CES1A1c altípus jelenléte vagy hiánya alapján ez a két haplotípus további két alcsoportba sorolható, így összesen négy haplotípust különböztetünk meg A, B, C és D jelöléssel (7. ábra) (*Rasmussen és mtsai 2018*). Mivel egy személy különféle kombinációjú haplotípust örökölhet a 2 szülőtől, változatos diplotípus kombinációk jöhetnek létre, amiben 2, 3 vagy 4 aktív CES1 másolattal is rendelkezhet egy egyén (*Stage és mtsai 2017*).

2.12. CES1 génvariációk hatásai az enzimaktivitásra

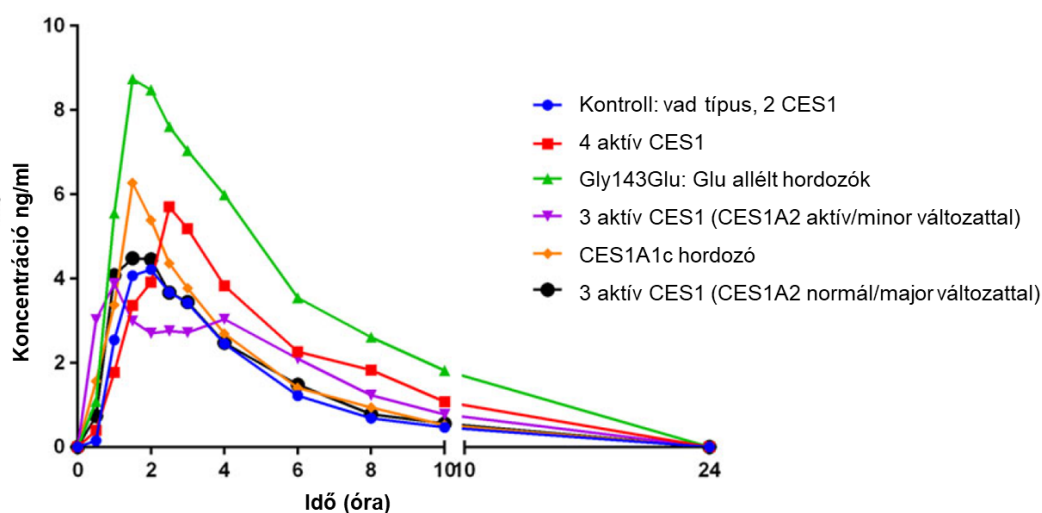
Egy nagy elemszámú farmakogenetikai vizsgálat 102 emberi máj mintán végzett angiotenzin konvertáz enzim gátlókkal (ACE gátlók) kísérletet, mérve a CES1 enzim aktivitását és meghatározva a CES1 és CES1P1 gének különböző haplotípusait (*Wang és mtsai 2015*). Specifikus genotipizálási módszerrel azonosították a 4 lehetséges CES1-CES1P1 haplotípust, és ennek megfelelően 8 különféle diplotípus csoportba osztották a mintákat. Az enzimaktivitás mérése során a különböző ACE gátlók prodrugból aktív hatóanyaggá alakulását mérték, amely hidrolízisért a CES1 enzim felelős. Érdekes módon a különböző CES1-CES1P1 diplotípusok nem különböztek szignifikánsan sem a génexpresszió mértékében, sem az enzimaktivitásban. Hasonló módszerrel ugyanez a munkacsoport további négy CES1 SNP-t vizsgált a vírus elleni oseltamivir gyógyszer hidrolízisének (*Shi és mtsai 2016*). Mindkét tanulmány vizsgálta a Gly143Glu polimorfizmus és az enzimaktivitás összefüggését is. Egybehangzó volt eredményük, miszerint a Gly143Glu heterozigóta variáns funkcióvesztést eredményezett. A 143 Glu allél jelenléte ugyanis szignifikánsan csökkentette az enalapril pro-drug aktív formává való átalakulását (Gly/Gly: $55,4 \pm 37,3$ pmol/min; Gly/Glu: $20,8 \pm 4,9$ pmol/min, *Wang és mtsai 2015*), illetve az oseltamivir pro-drug aktiválódását (Gly/Gly: $1,8 \pm 1,1$ nmol/mg; Gly/Glu: $0,7 \pm 0,2$ nmol/mg) (8. ábra), míg a fehérje expresszió mértékében nem volt szignifikáns különbség a két genotípus csoport között.



8. ábra: A máj CES1 polimorfizmusai és a CES1-CES1P1 diplotípusok hatása az oseltamivir hidrolízisére (Shi és mtsai 2016).

CES1 enzimaktivitás (oseltamivir hidrolízis) szignifikánsan csökkent a 143 Glu (A) allélt hordozó heterozigóta egyéneknél ($p = 0,005$), míg a többi vizsgált SNP (rs3785161, rs2244613, rs8192935) és a diplotípusok esetében nem volt eltérés az enzimaktivításban.

Hasonló eredményt mutatott egy dán kísérlet, amelyet az INDICES Consortium végzett 200 egészséges önkéntes bevonásával (*Stage és mtsai 2017*). Először megállapították mind a 200 személy CES1 diplotípusát, majd a genotipizálás eredménye alapján úgy választottak ki 43 egészséges önkéntest az MPH farmakogenetikai vizsgálatra, hogy a résztvevők különböző számú és típusú aktív CES1 variánsal rendelkezzenek. Végül 6 csoportba osztották a résztvevőket a feltehetően eltérő génexpresszió és/vagy enzimaktivitások alapján (9. ábra). Érdekes módon az aktív CES1 gén számok növekedése nem, csupán a 143 Glu allél hordozása jelentett szignifikáns hatást a CES1 bontási képességére.



9. ábra: A D-metilfenidát koncentráció az idő függvényében (*Stage és mtsai 2017*).

- Kontroll: vad típusú csoport (n = 17, kék kör), amelyben a résztvevőknek 2 CES1A1 és 2 CES1P1 génjük van (A/A diplotípus).
- 4 aktív CES1: 4 aktív CES1 génnel rendelkező csoport (n = 5, piros négyzet), ahol az egyéneknek a CES1A1 vagy CES1A1c mellett CES1A2 génjük van (B/B és a B/D diplotípusok).
- Gly143Glu: 143 Glu allélt hordozó heterozigóták (n = 6, zöld háromszög), A/A vagy A/B diplotípussal.
- 3 aktív CES1 (CES1A2 aktív/minor változattal): 3 aktív CES1 génkópiával rendelkező csoport (n = 2, lila háromszög), ahol a 2 vad típusú CES1A1 gén mellett van egy megnövekedett transzkripciós aktivitású CES1A2 aktív/minor változat.
- CES1A1c hordozó: csökkent transzkripciós aktivitású CES1A1c kópiával rendelkező csoport (n = 4, narancssárga ovális) (C/C vagy C/D diplotípusok).
- 3 aktív CES1 (CES1A2 normál/major változattal): 3 aktív CES1 génkópiával rendelkező *átlagos* csoport (n = 10, fekete kör), ahol a 2 vad típusú CES1A1 gén mellett egy csökkent transzkripciós aktivitású CES1A2 változat van (A/B diplotípus).

A farmakokinetikai vizsgálat eredménye szerint a görbe alatti terület értékre nézve a 143 Glu allél jelenléte erősen eltért a többi csoporttól, 149%-os gyógyszerszint emelkedést idézett elő a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,0001$). Ez az érték a 4 kópiával rendelkező csoport esetében 61% ($p = 0,011$), a CES1A1c kópiával rendelkező csoport esetében pedig 45% ($p = 0,028$) volt. A többi csoport esetében nem találtak szignifikáns különbséget. A maximális plazmakoncentráció vizsgálatánál a 143 Glu allél hordozás szignifikáns eltérést mutatott a kontroll csoporthoz képest, mind a *D*-MPH értéket tekintve ($p = 0,004$), mind a *D*-ritalinsav tekintetében ($p = 0,0001$). A *D*-MPH felezési idejét nézve csak a 143 Glu allélt hordozó csoport volt szignifikánsan eltérő a kontroll csoporthoz képest ($p = 0,0002$) (*Stage és mtsai 2017*).

3. Célkitűzések

Kutatómunkám során a gyermekkori ADHD genetikai rizikófaktorainak elemzését valamint a gyógyszeres kezelésben használt metilfenidát farmakogenetikájának vizsgálatát tűztük ki célul. Elemzéseinket kandidáns gének asszociáció vizsgálatával végeztük, melynek során a metilfenidát támadáspontjait, a katekolamin transzportereket, illetve a lebontó enzimét kódoló karboxilészteráz-gén funkcionális variánsát vizsgáltuk. Számos tanulmány és munkacsoportunk is foglalkozott korábban a dopamin transzporter génjének vizsgálatával. A noradrenalin transzporter génjét (NET, SLC6A2) kevesebben vizsgálták ADHD-val összefüggésben, pedig a NET is a metilfenidát egyik támadáspontja, ezért kutatómunkám során három fő célkitűzésünk volt:

1.A: A noradrenalin transzporter polimorfizmusok és az ADHD tünetei közötti összefüggések vizsgálata klinikai és átlagpopulációs gyermek mintán

Irodalmi adatok alapján olyan NET polimorfizmusokat választottunk ki, melyeket előzetesen kapcsolatba hoztak már ADHD-val, hogy az eset-kontroll típusú elemzéseink eredményeit össze tudjuk vetni az eddig publikált adatokkal egy metaanalízis keretében. Ezen kívül dimenzionális elemzéseinket mind klinikai, mind átlagpopulációs gyermek mintán terveztük kivitelezni szülői kérdőívek tünete súlyossági skáláit használva. Végül a NET SNP-k haplotípus elemzését terveztük, hogy részletesebb képet kapjunk az ADHD-ban vizsgált NET polimorfizmusok kombinált hatásáról.

1.B: A noradrenalin transzporter polimorfizmusok és a metilfenidát hatékonyság összefüggésének vizsgálata

Klinikai szempontból kiemelten fontos beteg gyermekek kezelésénél egy gyógyszer terápiás hatékonyságának megbecslése. Ezért a kiválasztott NET SNP-ket a metilfenidát hatékonyságának tekintetében is terveztük elemezni a farmakoterápiában részesülő ADHD alcsoporton belül. Farmakogenetikai eredményeinkkel metaanalízist is kívántunk végezni, hogy szélesebb körben fel tudjuk mérni az esetlegesen prediktív genetikai változatok hatását.

2. A karboxilészteráz 1 gén polimorfizmusának farmakogenetikai vizsgálata

Asszociáció elemzésünkhöz a metilfenidátot metabolizáló CES1 gén 2008-ban közölt funkcionális változatát választottuk ki. A publikációban szereplő CES1 variánsok közül a populációban gyakrabban előforduló, Gly143Glu aminosavcserével járó rs71647871 SNP vizsgálatát végeztük el.

4. Módszerek

4.1. A kutatásban résztvevő személyek

Genetikai vizsgálatainkat a Helsinki Nyilatkozat irányelvei alapján végeztük el, a kutatási protokollokat a helyi etikai bizottságok hagyták jóvá (az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Klinikofarmakológiai Kutatásetikai Bizottsága 2000. 11. 23-án, illetve az ETT TUKEB 2003. 01. 16-án, későbbi kiegészítéseket a 2005 és 2007-1018EKU írja le). A kutatás céljának ismertetése a DNS mintavétel előtt történt, majd a nagykorú résztvevők, illetve a beteg gyerekek és törvényes képviselőik beleegyező nyilatkozatot írtak alá. Mind a betegek, mind a kontroll egyének genetikai mintáit egyedi kódszámmal láttuk el, amely nem alkalmas az egyén azonosítására.

A pszichiátriai fődiagnózist a Vadaskert Kórház és Szakambulancián állapították meg 2001-2007 között, az akkor aktuális európai BNO-10 és kutatásokban széleskörben használt amerikai DSM-IV kritériumrendszer alapján (*American Psychiatric Association 1994*). A DSM-IV alkategóriák szerint nagyrészt (~70 %) kombinált típusú ADHD páciens volt. A kísérő kórképeket a MINI-kid (Mini-International Neuropsychiatric Interview, child version) segítségével állapították meg (*Balázs és mtsai 2004*). Asszociációs elemzéseinkből kizártuk azokat, akik súlyos neurológiai betegséggel vagy pervazív pszichés zavarral (pl. autizmus, szkizofrénia) rendelkeztek. Szintén kizártuk a vizsgálatból a 80-as intelligenciahányados alatti gyerekeket a Raven teszt alapján (*Raven 1965*).

A betegcsoport eredetileg 173 gyermekből állt, a részletes demográfiai eloszlást és a klinikai adatokat az 1. táblázat tartalmazza. A kutatásban résztvevő betegek DNS mintái közül 163 használható a mai napig a Semmelweis Egyetem biobankjában, ezért későbbi publikációinkban néhol alacsonyabb elemszámok jelennek meg. Az ADHD-val diagnosztizált gyermekek közül 122 betegnél kezdtek el metilfenidát (Ritalin) kezelést, így a farmakoterápia elkezdése előtti és utáni tüneteiket is rögzítették (havonta). A betegek napi 10-30 mg MPH-t kaptak testsúlytól függően, kétszer (reggel és délben) fél, egy, vagy másfél 10 mg-os tablettá adagolásban. Ennek megfelelően az alkalmazott napi dózis 0,22–0,95 mg/ttkg/nap volt, átlagosan $0,55 \pm 0,15$ mg/ttkg/nap. A résztvevők semmilyen más pszichoaktív gyógyszert nem kaptak a vizsgálat során.

1. táblázat: A gyógyszeres kezelésre jól reagáló és nem reagáló ADHD-s gyermekcsoportok demográfiai és klinikai jellemzői

		Összes (n = 173)		Jól reagáló (n = 90)		Nem reagáló (n = 32)		statisztika
		N	freq (%)	n	freq (%)	n	freq (%)	
Nem	fiú	151	87,3	78	86,7	30	93,8	$\chi^2(1) = 1,17, p = 0,35^*$
	lány	22	12,7	12	13,3	2	6,3	
Kor (átlag \pm szórás)		9,14 \pm 2,60		9,52 \pm 2,45		9,77 \pm 2,85		$t(1,120) = 0,48, p = 0,63$
ADHD								
Típus	kombinált	124	71,7	68	75,6	27	84,4	$\chi^2(2) = 1,92, p = 0,38$
	hiperaktív	24	13,9	10	11,1	1	3,1	
	figyelemhiányos	25	14,4	12	13,3	4	12,5	
Súlyosság	középsúlyos	55	31,8	24	26,7	5	15,6	$\chi^2(1) = 1,59, p = 0,21$
	súlyos	118	68,2	66	73,3	7	84,4	
Az MPH átlagos dózisa (mg/kg/day)				0,56 \pm 0,16		0,51 \pm 0,14		$t(1,120) = 1,58, p = 0,12$
Komorbidity adatok								
	LD	53	30,6	34	37,8	11	34,4	$\chi^2(1) = 0,12, p = 0,73$
	CD	50	28,9	27	30,0	13	40,6	$\chi^2(1) = 1,21, p = 0,27$
	Hangulatzavar	23	13,3	10	11,1	3	9,4	$\chi^2(1) = 0,75, p = 1,0^*$
	TS	21	12,1	9	10,0	4	12,5	$\chi^2(1) = 0,16, p = 0,74^*$

A metilfenidát (MPH) kezelésre jól reagáló és a nem reagáló csoportokba tartozó független minták t-próbáját és Pearson-féle Kínégyszet próbáját számítottuk ki és hasonlítottuk össze, a p jelentése kétoldalas szignifikancia érték, * a Fisher teszt szignifikanciája

LD: learning disorder, tanulási zavar; CD: conduct disorder, magatartászavar; TS: Tourette-szindróma

A kezelés során használt MPH gyógyszerre adott válasz kategorizálása egy korábban publikált kritériumrendszer szerint történt (*Kereszturi és mtsai 2008*). Röviden összefoglalva, a gyógyszerre nem reagálók esetében az ADHD tünetsúlyossági becslőskála (ADHD Rating Scale, ADHD-RS, *DuPaul 1998*) összpontszáma kevesebb, mint 10%-ot csökkent a 2 hónapos terápiát követően (a gyógyszerre nem reagálók mindegyike befejezte a farmakoterápiát 2 hónap után). A gyógyszerre jól reagálók ADHD-RS összepontszáma legalább 25%-kal csökkent az első 2 hónap során, és emellett a tüneteik vagy teljesen megszűntek, vagy minimálisra csökkentek az 5. hónap végére a klinikai kérdőív (Clinical Global Impression, CGI, *Guy 1976*) tünetsúlyossági skáláját alkalmazva. E kritériumrendszerek alapján a vizsgált betegcsoportból 90 gyerek jól reagált a kezelésre és 32 gyerek került a nem reagálók csoportjába (adataikat lásd a 1. táblázatban).

Az eset-kontroll elemzésekhez kétféle kontroll csoportot használtunk. Az egyik fajta kontroll csoport résztvevői egészséges fiatal felnőttek voltak, akiket Dr. Székely Anna irányítása alatt az Eötvös Loránd Tudományegyetem Pedagógiai és Pszichológiai Kar Pszichológia Intézetének munkatársai toboroztak különböző felsőoktatási intézményekben. Az első asszociáció vizsgálatunkban 268 egyetemista DNS mintáit analizáltunk (átlagéletkor: $20,51 \pm 1,83$ év; 50,4% férfi, lásd *Nemoda és mtsai 2009*). Később ez a kontroll csoport kibővült rendőrtiszti főiskolai hallgatókkal (*Varga és mtsai 2012*). A résztvevők önbevallásos kérdőíveket töltöttek ki, melyek alapján sem krónikus szomatikus (pl. cukorbetegség), sem pszichiátriai betegséggel nem rendelkező egyéneket válogattunk be a genetikai elemzésünkbe. A jó minőségű DNS mintával rendelkező 700 kontroll személyből az ADHD betegcsoportban kapott nemi aránynak megfelelően választottunk ki 400-at (az ún. nemben illesztett kontroll csoport, átlagéletkor: $22,7 \pm 4,2$ év; 87% férfi, lásd *Angyal és mtsai 2018*).

A figyelemhiány tünetsúlyosság kvantitatív elemzéséhez egy kisebb elemszámú, alacsony társadalmi rizikójú (úgymond átlagpopulációból származó) gyermek mintából álló kontroll csoportot is vizsgáltunk ($n = 88$; 59,1% fiú; átlagéletkor: $6,3 \pm 0,2$ év). Ebből a 88 főből álló csoportból az ADHD eset-kontroll vizsgálathoz csak 86 gyermek adatait használtuk fel, mert 2 gyermek ADHD diagnózis miatt kizárásra került. Fontos megemlíteni, hogy az utánkövetéses Budapest Család Vizsgálatban csak egészséges elsőszülött gyerekek vettek részt, mindannyian a 37. terhességi hét után születtek és

születési súlyuk minimum 2500 g volt. A 6 éves gyermekcsoport részletes pszichológiai jellemzésében a Gyermekviselkedési kérdőív is szerepelt (Child Behavior Checklist, CBCL *Achenbach 1991*, magyar verzió: *Gádoros 1996*), melynek alapján az édesanyáktól kapott információ tartalmazta a figyelmi zavarok skálát.

A CBCL adatokkal rendelkező beteg minta bővítése érdekében a klinikai adatbázisunkból további 72 tik zavarral (de nem ADHD-val) diagnosztizált beteget is bevettünk, így összesen 192 betegből állt az ún. „kiterjesztett” gyermekpszichiátriai minta (átlagéletkor: $10,0 \pm 3,2$ év, 81,3% fiú). A 120 ADHD-val diagnosztizált beteg közül 30%-nak Tourette-szindrómája, 14,2%-nak kényszeres zavara, 27,5%-nak tanulási nehézsége, 23,3%-nak magatartászavara és 14,2%-nak szorongásos zavara is volt. A kiterjesztett gyermekpszichiátriai mintában a betegek 62,5%-át ADHD-val, 35,4%-át Tourette-szindrómával, 34,4%-át kényszeres zavarral, 19,3%-át tanulási nehézséggel, 16,1%-át magatartászavarral és 26,0%-át szorongásos zavarral diagnosztizálták.

A vizsgálatokban az összes résztvevő – mind a beteg, mind a kontroll csoportok tagjai – etnikailag homogén csoportot alkottak, kaukázusi volt minden alany (magyar szülőktől származtak).

4.2. DNS izolálás

A DNS izolálás szájnyalkahártya mintákból történt. A DNS mintavétel non-invazív módszerrel történt, a résztvevők vattapálcával 15–20 másodpercig dörzsölték az íny és a belső száj nyálkahártya felületét. Egy személytől két független mintát kértünk (A és B minta) és a mintákat feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. A DNS izolálás előtti napon a vattapálcákra 400 μ l ösztérfogatú mintavevő puffert mértünk (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH = 8,0), 0,5% SDS és 0,2 mg/ml proteináz K), majd a mintákat egy éjszakán át 56 °C-on inkubáltuk, ezalatt a sejtek lizáltak, a nátrium-lauril-szulfát (SDS) denaturálta, a proteináz K pedig megemésztette a fehérjéket. Ezután a DNS tartalmú lizátumot centrifugálással (2000 g, 10 perc) távolítottuk el a vattapálcákról. A DNS-t az így kapott oldat 350 μ l-jéből nyertük ki, amelyben először 0,4 mg RNáz A-val elemésztettük az RNS-eket, majd 6 M-os NaCl oldattal kicsaptuk a fehérjéket. A második centrifugálás (13000 g, 10 perc, 4°C) után a DNS a felülúszóban maradt, melyet izopropanol és glikogén segítségével csapadékba vittünk. A DNS csapadékot centrifugálással (16000 g, 15 perc, 4°C) kinyertük, majd 70%-os etanolos mosás után

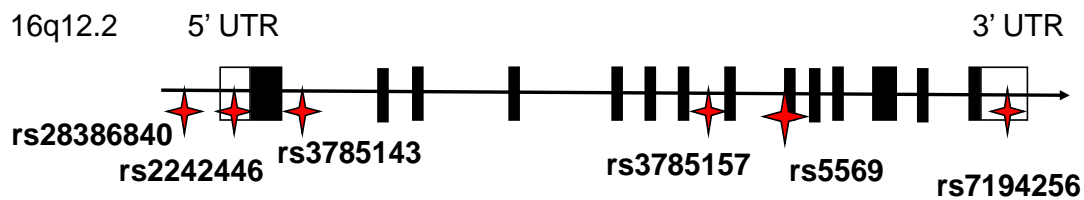
megszárítottuk, és végül 10 mM Tris (pH = 8) és 1 mM EDTA-t tartalmazó pufferrel feloldottuk. A DNS koncentrációját Nanodrop készüléssel mértük, és ez alapján 2-10-szeres hígítást készítettünk, hogy átlagosan 10-20 ng/μl koncentrációjú mintákkal végezzük a genotipizálást.

4.3. Genotipizálási módszerek

Előzetesen olyan, már ADHD-val kapcsolatba hozott SNP-eket válogattunk, melyek egy finn kaukázusi populációban mért adatok alapján különböző haplotípus blokkokban helyezkedtek el (*Belfer és mtsai 2004*). Csak olyan SNP-eket vizsgáltunk, amelyeknek a ritka allél frekvenciája legalább 5% volt kaukázusi populációban. Mivel a noradrenalin transzporter génjének (NET, SLC6A2) kódoló szakaszában eddig nem írtak le gyakori funkcionális variánst (azaz a ritka allél frekvenciája / minor allele frequency > 10%), előzetes asszociáció elemzések alapján választottunk ki két intronikus és egy exonban elhelyezkedő SNP-t az 5' és 3' szabályozó régióban elhelyezkedő polimorfizmusok mellett (10. ábra).

Az ADHD-val kapcsolatos asszociációs vizsgálatok többször rámutattak a NET gén első felében található intronikus polimorfizmusokra (rs3785143 az 1. intronban és az rs11568324 az 5. intronban). Mivel az intronikus polimorfizmusok közül az rs11568324 SNP ritka (minor) allél frekvenciája nagyon alacsony (2% alatti), ezért nem vettük bele vizsgálatainkba, és inkább a 7. intronban található rs3785157 C/T SNP-t elemeztük.

Elsődlegesen a NET gén 5' és 3' UTR-ében található, valószínűsíthetően funkcionális génvariánsokat választottuk ki: a promoter régióból a -182 C/T (rs2242446) és a -3081 A/T (rs28386840) polimorfizmusokat, a 3' végről a 3338 C/T (rs7194256) SNP-t. A többi NET polimorfizmust mind széles körben publikált SNP-k közül választottuk, így a vizsgálati panelbe bekerült az 1. intron (rs3785143) C/T SNP-t, a 7. intron (rs3785157) C/T és a 9. exon (rs5569) A/G SNP.



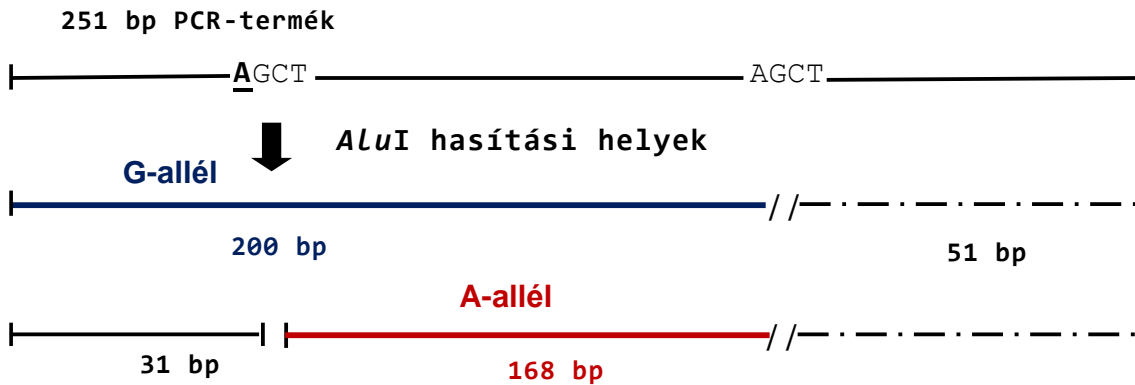
10. ábra: A noradrenalin transzporter (NET) gén vizsgált polimorfizmusai.

A fekete téglalapok az exonokat, az üres téglalapok az UTR-eket jelzik. Piros csillagok jelölik a vizsgált SNP-eket. Megjegyzés: az NCBI és Ensembl adatbázisok 15 exont jelölnek, melyek közül az első nem kódoló (a transzkripció a 2. exonban kezdődik), de a legtöbb publikációban az ábrán is látható elrendezésben az 1. exonban kezdődik a transzkripció, ezért mi is ezt az exon-intron számozást használtuk.

A NET SNP-k genotípusait valós idejű (Real-Time) PCR módszerrel határoztuk meg előre tervezett TaqMan SNP kitek használatával (rs28386840: C_60398891_10; rs2242446: C_26354911_10; rs3785143: C_27481932_10; rs3785157: C_27481947_10; rs5569: C_3020068_10; rs7194256: C_29079520_10, Applied BioSystems). A genotipizálás során a polimorf allélok megkülönböztetésére szekvenspecifikus jelölt próbákat használtunk (FAM és VIC, a cég által tervezett szekvenciákkal). A reakció 7300 Real-Time PCR System (Applied BioSystems) alkalmazásával, 6 µl végtérfogatban zajlott, kb. 10 ng genomiális DNS templát alkalmazásával. A termociklus első lépése 95 °C kezdeti denaturáció volt 10 percig (genomiális DNS denaturálása és a DNS-polimeráz aktiválása). Ezt követte 40 ciklus, ciklusonként 15 másodperc denaturálás 95 °C-on; majd 1 perc anneálás és extenzió, mindkettő 60 °C-on; itt történt a fluoreszcencia jel leolvasása is ciklusonként. A termociklus végpontjában történő jelintenzitás mérés (end-point analysis) alapján a program egy olyan koordináta rendszerben ábrázolja a mintákat, ahol a kétféle fluoreszcens jel intenzitása adja a tengelyeket. A kétséges mintáknál elemeztük a ciklusonként elmentett fluoreszcencia jel értékeit.

A CES1 Gly143Glu SNP (rs71647871, A/G) genotipizálása során kétféle módszert próbáltunk ki. Először elvégeztük a genotipizálást előzetesen közölt primerekkel és allél-specifikus próbákkal (Zhu és mtsai 2008) 7300 Real-Time PCR System (Applied BioSystems) alkalmazásával. A módszert 6 minta (4 heterozigóta és 2 homozigóta) szekvenálásával ellenőriztük. Ezen kívül az ADHD betegek minták genotípusait meghatároztuk restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) módszerrel is. A

PCR reakció során Zhu és mtsai által publikált 5'-CCCAGGTGATGGTGTGGAT-3' forward primert és egy saját tervezésű 5'-GCCTTACTGTGGAACCTAGCTAAGC-3' reverse primert használtuk, hogy egy kontroll hasítási helyet is tartalmazzon a PCR-fragmens. A restriktions emésztés teljességét jelezte, hogy az eredeti 251 bp PCR-fragmens nem volt jelen a mintákban (11. ábra).



11. ábra: A CES1 gén Gly143Glu SNP (rs71647871) genotipizálása RFLP módszerrel.

A PCR-terméket *AluI* restriktions enzimmel emésztettük, ugyanis az A (Glu) allél esetén egy AGCT restriktions enzim felismerő hely található a szekvenciában. A 143 Glu allél esetén kialakuló 168 bázispár hosszúságú fragmentum jól elkülöníthető a 143 Gly specifikus 200 bp hosszú fragmentumtól gélelektroforézissel. Az 51 bp hosszú kontroll hasítási fragmens a primer-dimerekkel futott, így az sokszor nem jelent meg külön fragmentumként.

A reakciót 8 µl végtérfogatú PCR eleggyel végeztük, amelynek összetevői a következők voltak: 200 µM dNTP; 1 µM primer pár; 0,2 U Qiagen® HotStarTaq™ DNS polimeráz; a gyártó által forgalmazott puffer és adalék (Q-oldat, mely az optimális annealást biztosítja GC gazdag régiókban); valamint kb. 10 ng DNS templát. Az alkalmazott termociklus első lépése 95 °C kezdeti denaturáció volt 15 percig (a genomiális DNS denaturálása és a hot start enzim aktiválása). Ezt követte 40 ciklus, ciklusonként 1 perc denaturálás 94 °C-on; 30 másodperc anneálás 56 °C-on és végül 1 perc extenzió 72 °C-on. A 72 °C-os 10 perces végső extenzió után a mintákat 8 °C-ra hűtöttük le, ezzel zárva a PCR amplifikációt. A PCR-termékhez 10 µl *AluI* restriktions enzim mixet adtunk a Fermentas cég által ajánlott pufferben, BSA-val kiegészítve. Az elegyet minimum 3 órán keresztül inkubáltuk a restriktions enzimmel 37 °C-on, majd gélelektroforézissel választottuk el a fragmenseket (1,5%-os agaróz és 2% metaphor gél keverékében), 40

mM Tris-acetátot (pH = 8) és 2 mM EDTA-t tartalmazó (TAE) futtató pufferben, 7 V/cm térerő alkalmazásával. A futtatás után a gélt etídium-bromid oldatban festettük és a Bioanalyzer (Agilent) programmal vizualizáltuk.

Sem az eset, sem a kontroll csoportokban nem találtunk szignifikáns eltérést ($p > 0,05$) a Hardy-Weinberg egyensúlytól, egyik polimorfizmus esetében sem.

4.4. Genetikai asszociáció analízisek

Az eset-kontroll típusú elemzésekhez a χ^2 tesztet használtuk az SPSS statisztikai programmal, míg a haplotípus elemzésekhez az Unphased programot (*Dudbridge 2008*) futtattuk le. Azoknál a polimorfizmusoknál, ahol kevés számú homozigóta egyed volt a ritka allélra nézve csak 2 x 2 csoportot hasonlítottunk össze (pl. CES1 Gly143Glu SNP-nél nem volt AA homozigóta egyik csoportban sem).

A NET polimorfizmusok kapcsoltóságát a Haploview program felhasználásával ellenőriztük (*Barrett és mtsai 2005*), mely megadja a D' és r^2 értékeket. A többszörös statisztikai elemzések szignifikancia korrekciójára a False Discovery Rate (*Benjamini és mtsai 2001*) kalkulációt használtuk, mely figyelembe veszi a független elemzések számát, így a 6 NET SNP elemzésekor a határértéke $p < 0,008$ volt.

A metilfenidát hatékonyság kvantitatív elemzéséhez az ADHD tünetsúlyossági becslőskála figyelemhiányos, illetve hiperaktív-impulzív értékeinek első hónapot követő változásait használtuk fel. A tünetsúlyossági skálákon bekövetkező pontszámcsökkenés genetikai asszociáció elemzése a Thesias program segítségével történt (*Tregouet és Garelle 2007*).

A figyelemzavar dimenzionális elemzéséhez az SPSS statisztikai program varianciaanalízisét használtuk, függő változóként a CBCL figyelmi zavarok skáláján kapott nyers pontszám transzformált, standardizált értékével, független változóként a genotípus kategóriával (fő allélra homozigóták vs. ritka allélt hordozók). Szükség esetén a nem és az életkor szerepelt kovariánsként az elemzésben. Az átlagpopulációs gyerek mintában a figyelemzavar pontszámok normál eloszlástól való eltérése miatt a nem-paraméteres Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. A becsült haplotípusok asszociáció elemzését a Thesias programmal végeztük (*Tregouet és Garelle 2007*).

4.5. Metaanalízis

Három elektronikus adatbázisban (PubMed, MEDLINE, PsycINFO) végeztünk irodalomkutatást az alábbi kulcsszavak kombinációjával: „ADHD / inattention / hyperactivity / hyperkinetic” (ADHD / figyelemhiány / hiperaktivitás / impulzivitás) + “norepinephrine transporter / noradrenaline transporter / SLC6A2 / NET / NAT” (norepinefrin transzporter / noradrenalin transzporter / SLC6A2 / NET / NAT) + “gene / polymorphism” (gén / polimorfizmus). A keresés eredményeképpen a PubMed adatbázisában 1072 publikációt találtunk 2017 áprilisáig, a PsycINFO (Ovid) adatbázisban ezeken felül még 38-at, míg a Medline (Ovid) adatbázisában további 46-ot. Csak eredeti kutatásból származó genetikai asszociáció vizsgálatot és ADHD-val diagnosztizált betegekkel kapcsolatos (farmako)genetikai eredményeket vettünk bele a metaanalízisbe. A duplikációk szűrése után így 206 publikációt elemeztünk részletesen. A beválasztási kritériumok a következők voltak: (1) önálló kutatási eredmények, (2) angol nyelvű publikáció, (3) ADHD betegcsoport és (4) NET polimorfizmus eredmények. Azokban az esetekben, ahol a részletes genotípus adatokat nem publikálták, e-mailben megkerestük a szerzőket és elkértük a hiányzó adatokat. A további feldolgozás és szűrés eredményeképpen a saját eredményeinken kívül 20 közölt irodalmi adat került bele a metaanalízisünkbe. Összesen 29 tanulmányt zártunk ki a vizsgálatból. A kizárás kritériumai a következők voltak: (1) más, kevésbé gyakran vizsgált NET polimorfizmusok ($n = 4$), (2) nem eset-kontroll tanulmányok ($n = 11$), (3) átfedő adatok ($n = 10$) és (4) ahol nem állt rendelkezésünkre megfelelő genotípus adat és nem kaptunk választ a megkeresésünkre sem ($n = 4$).

A metaanalízist a Comprehensive Meta-Analysis szoftver program segítségével végeztük (Borenstein és mtsai 2005). Külön metaanalízisben vizsgáltuk a családon belüli allél transzmisszió eredményeit, és külön-külön metaanalízist végeztünk az allélfrekvencia szerinti és a genotípus eloszlás szerinti eset-kontroll tanulmányokra. Azok a publikációk, amelyek csak egyik formában tartalmaztak adatokat, azok csak az adott típusú metaanalízisbe kerültek bele. Az esélyhányados (OR: odds ratio) kiszámításával standardizáltuk a vizsgálati eredményeket, összevetve az összes esetet a kontrollok számával. A statisztikai értékelés során az esélyhányados, konfidencia intervallum (CI: confidence interval) és Z-érték számításokat végeztük el. A homogenitás ellenőrzésére Cochran Q statisztikai elemzést használtunk, mellyel a publikációkban megadott korrelációk hatásnagyságát (angol kifejezéssel effect size) hasonlítottuk össze.

5. Eredmények

5.1. A noradrenalin transzporter gén asszociáció vizsgálata ADHD-val

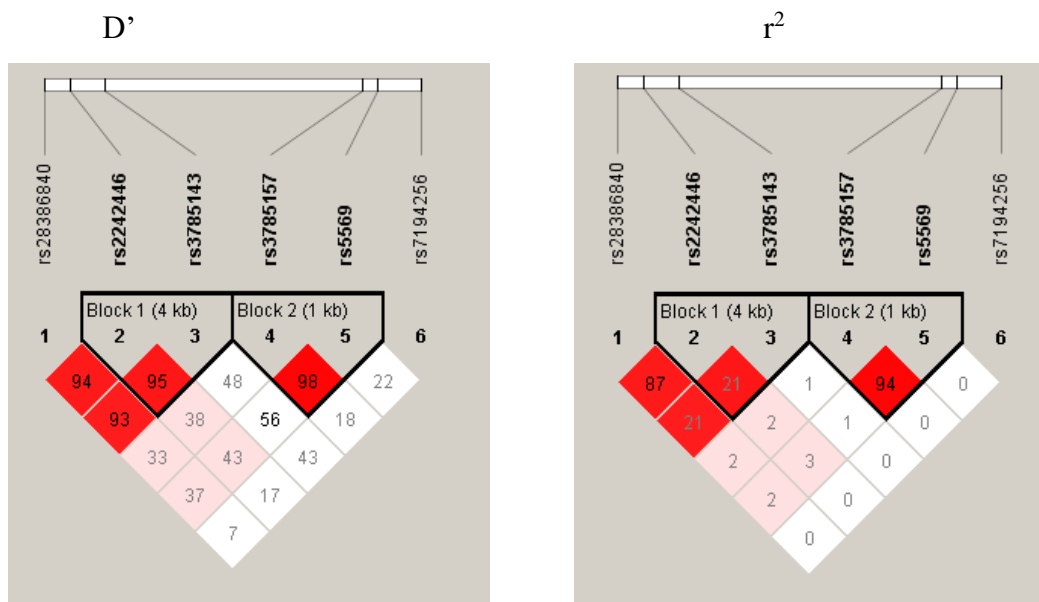
Az eset-kontroll vizsgálataink során 163 ADHD-val diagnosztizált gyerek (86,5% fiú, átlagéletkor: $9,3 \pm 2,6$ év) és 400 nemből illesztett, fiatal felnőtt kontroll személy (87% férfi, átlagéletkor: $22,7 \pm 4,2$ év) adatait vetettük össze. Később egy kis elemszámú ($n = 86$), iskolakezdés előtt álló kontroll gyermek csoport adatait is elemeztük (59,1% fiú, átlagéletkor: $6,3 \pm 0,2$ év). Az eset-kontroll vizsgálatok nem mutattak szignifikáns összefüggést sem az allél, sem a genotípus szerinti eloszlásban egyik vizsgált NET SNP esetében sem (p értékek $> 0,1$, a hasonló genotípus frekvenciákat lásd a 2. táblázatban). Genotípus és allél eloszlás tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két kontroll csoport között sem (p értékek $> 0,1$). A haplotípus frekvenciákban sem találtunk különbséget a kontroll- és a betegcsoport genetikai adatait összevetve.

2. táblázat: A NET gén polimorfizmusainak genotípus eloszlása az ADHD-s gyermek, gyermek kontroll és a nemben illesztett kontroll csoportban. DOI: 10.14753/SE.2021.2553

Polimorfizmus		promoter rs28386840 (-3081 A/T)			promoter rs2242446 (-182 C/T)			1. intron rs3785143 (1. intron C/T)			7. intron rs3785157 (7. intron C/T)			9. exon rs5569 (1287 A/G)			3' UTR rs7194256 (3338 C/T)		
		AA	AT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG	CC	CT	TT
gyermek ADHD	N	85	60	18	19	64	80	131	31	1	79	70	14	13	72	78	121	39	3
beteg	%	52,1	36,8	11,0	11,7	39,3	49,1	80,4	19,0	0,6	48,5	42,9	8,6	8,0	44,2	47,9	74,2	23,9	1,8
gyermek kontroll	N	40	37	9	9	37	40	66	20	0	41	38	7	7	38	41	57	26	3
(kor: 6-7 év)	%	46,5	43,0	10,5	10,5	43,0	46,5	76,7	23,3	0,0	47,7	44,2	8,1	8,1	44,2	47,7	66,3	30,2	3,5
p érték		0,853			0,949			0,281*			0,432			0,490			0,247*		
felnőtt kontroll	N	196	159	45	38	170	192	327	69	4	214	147	39	41	150	209	290	102	8
(nemben illesztett)	%	49,0	39,8	11,3	9,5	42,5	48,0	81,8	17,3	1,0	53,5	36,8	9,8	10,3	37,5	52,3	72,5	25,5	2,0
p érték		0,782			0,653			0,703*			0,390			0,306			0,674*		

* kis elemszám miatt a ritka homozigóták a heterozigótákkal összevonva

A kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság (LD: linkage disequilibrium) Haploview program segítségével nyert eredményeit az 12. ábra tartalmazza. A vizsgált SNP-k közül egyik pár sem volt teljes kapcsoltságban az általunk vizsgált magyar populációban, de a 7. intron C/T (rs3785157) és a 1287 A/G (rs5569) SNP-k esetében közel teljes kapcsoltság mutatkozott: $D' = 0,98$; $r^2 = 0,94$, így ez a két SNP egy haplotípus blokkban van. A promoter régióban lévő két SNP: -3081 A/T (rs28386840) és -182 C/T (rs2242446), valamint az 1. intron C/T (rs3785143) SNP kapcsoltságára szintén magas D' értékeket kaptunk, ami a gén 5' végén található polimorfizmusok kapcsoltságára utal. Azonban az alacsony r^2 értékek jelzik, hogy a kapcsoltság sokkal gyengébb (ez a korrelációs koefficiens ugyanis az allél frekvenciákat is figyelembe veszi).

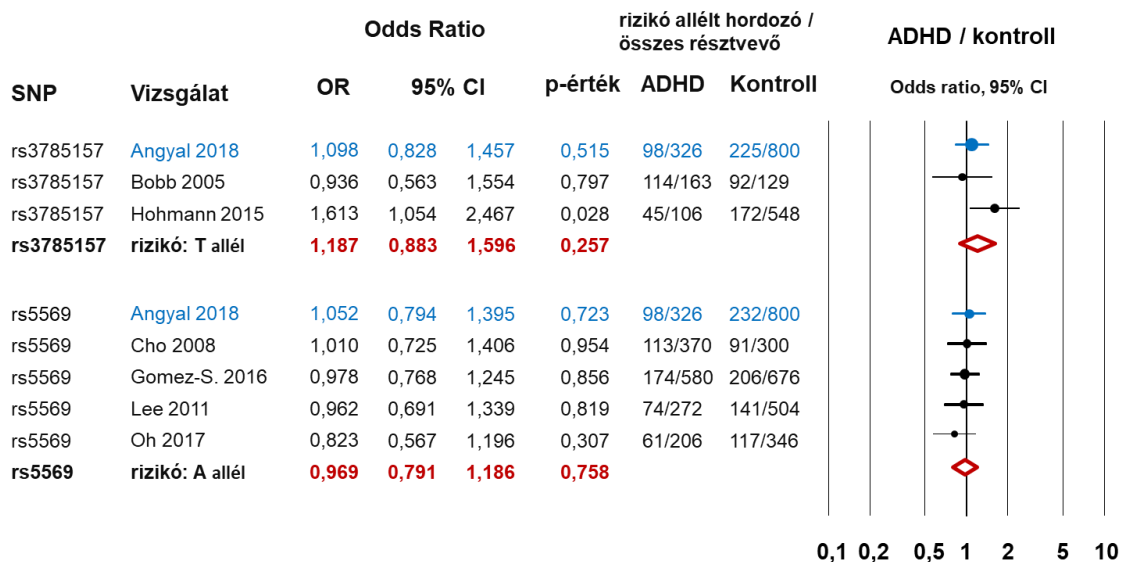
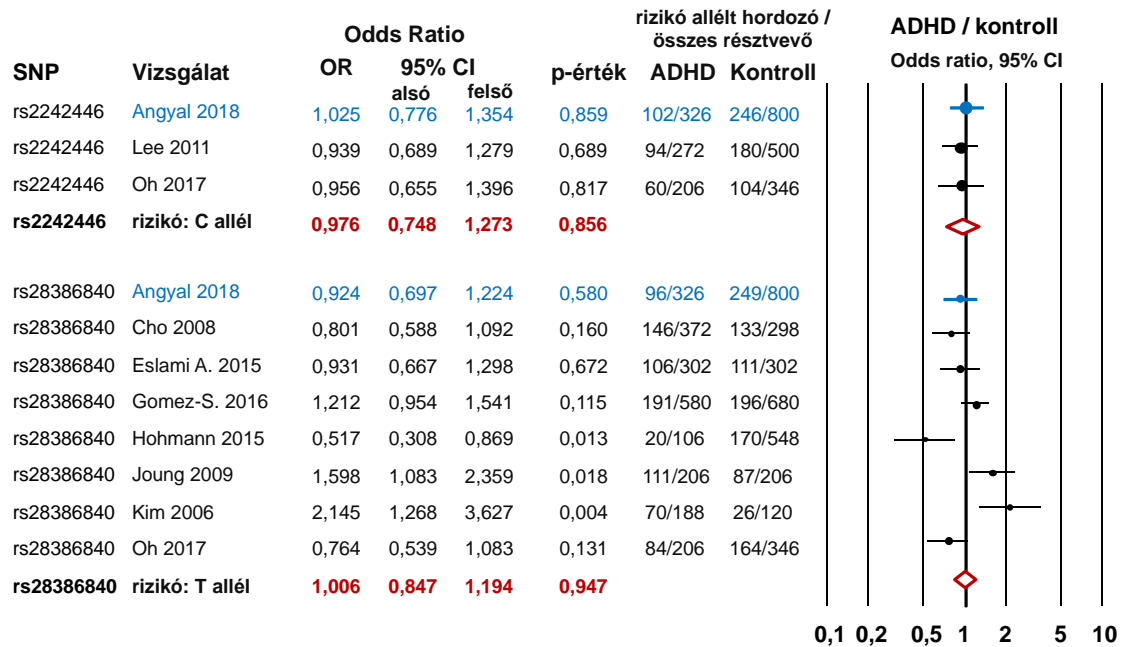


12. ábra: NET polimorfizmusok kapcsoltsága a Haploview program alapján.

Az ábra bal oldalán a Lewinton-féle D' (ún. standardizált LD-koefficiens) értékek (0-100 skálán), jobb oldalán az r^2 korrelációs koefficiens értékek láthatók. A vizsgált gén a kép tetején látható, rajta méretarányosan látható a vizsgált hat SNP elhelyezkedése. Ugyan a program csak az rs2242446 és rs3785143 között rajzol ki egy blokkot, de a kapcsoltsági értékei alapján a rs28386840 SNP-t is az 5' végű haplotípus blokkba soroltuk.

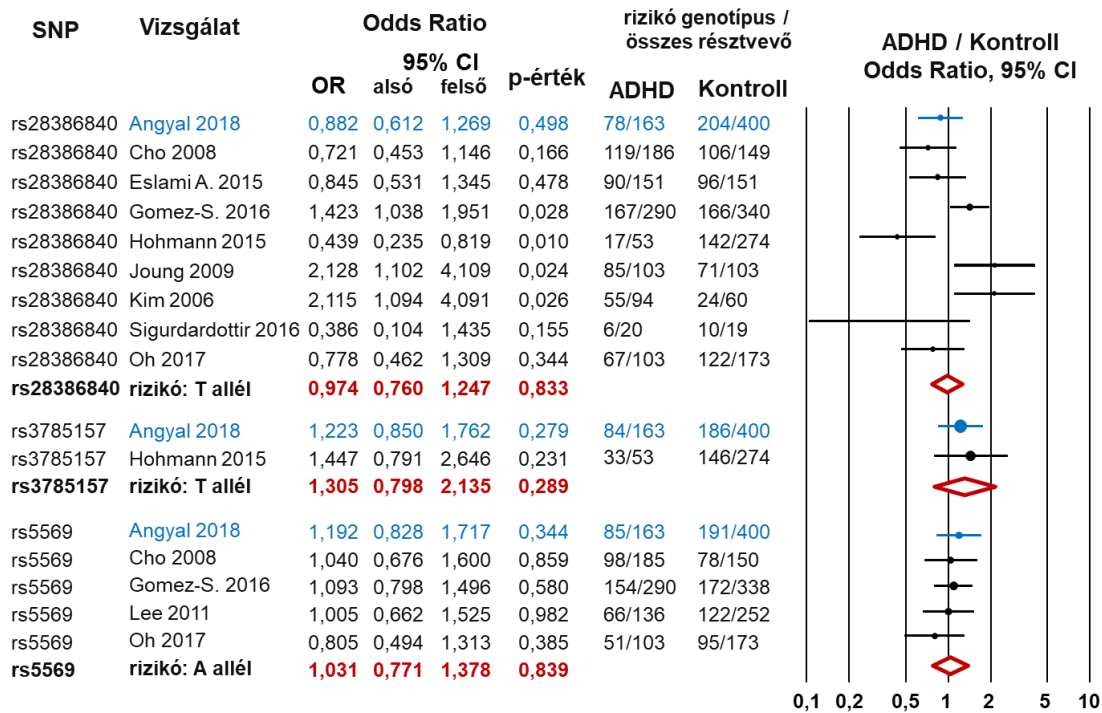
Ezután metaanalízist végeztünk az irodalomban elérhető eset-kontroll vizsgálatok felhasználásával, bevonva a saját eredményeinket is. Az eset-kontroll vizsgálatok nem mutattak szignifikáns összefüggést sem allél szerinti csoportosításban (az öt leggyakrabban vizsgált SNP-re lásd 13. ábra), sem genotípus szerint elemezve (a kevesebb

nyers adat miatt ezt csak három SNP-re tudtuk lefuttatni, lásd 14. ábra). A gén 3' végről választott rs7194256 szerepére csak az elmúlt években jelentek meg publikációk, így ezzel az SNP-vel nem találtunk elemzésünkig (2017 áprilisáig) jelentős mennyiségű adatot, ezért nem sikerült erre metaanalízist lefuttatni.



13. ábra: A NET polimorfizmusok és az ADHD diagnózis összefüggésének metaanalízise az eset-kontroll vizsgálatok alapján, allél szerinti elemzésben.

Az irodalomban elérhető adatokkal és a saját eredményeinkkel (lásd „Angyal 2018” sor) a négy leggyakrabban vizsgált SNP-re végeztük el a metaanalízist, amelyek nem mutattak szignifikáns összefüggést (vastagítva kijelölt sorok, piros rombusz jelek).



14. ábra: A NET polimorfizmusok és az ADHD diagnózis összefüggésének metaanalízise az eset-kontroll vizsgálatok alapján, genotípus szerinti elemzésben.

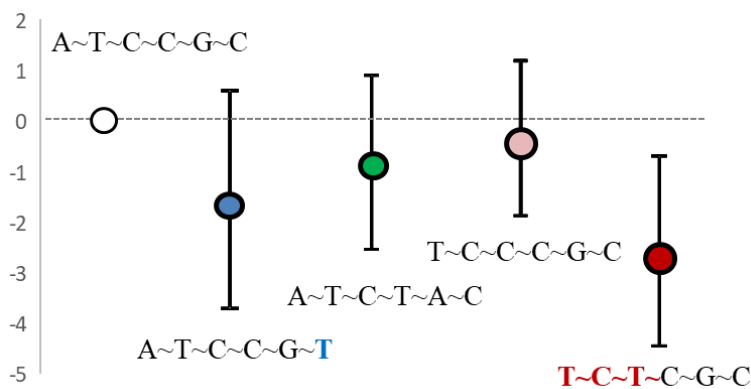
Az irodalomban elérhető adatokkal és a saját eredményeinkkel (lásd „Angyal 2018” sor) három SNP-re tudtunk csak elvégezni a metaanalízist, amelyek nem mutattak szignifikáns összefüggést (vastagítva kijelölt sorok, piros rombusz jelek).

5.2. A noradrenalin transzporter polimorfizmusok asszociáció vizsgálata figyelemzavarral

Az ADHD-val kezelt gyerekek szülei (általában édesanya) által kitöltött kérdőívek adataival végeztünk dimenzionális elemzéseket, a DSM-IV tünetek súlyosságát felmérő ADHD-RS skála, valamint a Gyermekviselkedési kérdőív (CBCL) figyelmi zavarok nevű skálájának felhasználásával. Az utóbbi kérdőív adatai egy átlagpopulációs mintában 6 éves gyerekekről is rendelkezésünkre álltak. A statisztikai analízis során a ritka homozigóta és heterozigóta személyeket összevontuk, a statisztikai erő növelése érdekében.

Az első intronban található C/T (rs3785143) polimorfizmus összefüggést mutatott az ADHD-RS figyelemhiányos tünetek súlyosságával: a T allélt hordozók szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutattak (CC: $16,28 \pm 4,67$; CT és TT: $13,88 \pm 5,15$, $F(1,161) = 6,57$; $p = 0,011$). A szomszédos, promóter régióban található -182 C/T (rs2242446) polimorfizmus pedig tendenciózus asszociációt mutatott a figyelemhiányos tünetek súlyosságával: a C allélt hordozóknak alacsonyabb pontszámuk volt (CC és CT: $15,10 \pm$

4,92; TT: $16,55 \pm 4,68$, $F(1,161) = 3,73$; $p = 0,055$). A statisztikai elemzéseink eredményei hasonló tendenciát mutattak az összes ADHD tünetsúlyossági értékre (nominális p érték: $0,05 < p < 0,1$). Többszörös tesztelésre korrigálva azonban egyik megfigyelt asszociáció sem maradt szignifikáns (a vizsgált 6 SNP-ből egyik asszociáció p értéke sem lett alacsonyabb, mint 0,008). Mind a hat vizsgált NET SNP haplotípus elemzését elvégezve, a T~C~T~C~G~C haplotípus mutatott szignifikánsan alacsonyabb figyelemhiányos tünetsúlyosság értékeket, a leggyakoribb A~T~C~C~G~C haplotípussal szemben ($p = 0,003$), azt jelezvén, hogy az 5' végi polimorfizmusok játszhatnak szerepet a figyelemhiányos tünetek kialakulásában. A többi haplotípus ugyan mind alacsonyabb pontszámot mutatott az A~T~C~C~G~C haplotípushoz hasonlítva, ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak (lásd az alapszintet metsző 95% konfidencia intervallum értékeket a 15. ábrán).



15. ábra: Az ADHD-RS figyelemhiányos tünet pontszámának különbségei a leggyakoribb NET haplotípus csoportoknál.

Csak azokra a haplotípusokra számolt a THESIAS program, melyek az ADHD betegcsoportban 5%-nál nagyobb frekvenciában voltak jelen. Az y-tengelyen látható pontszám-különbségek a leggyakoribb -3081 A ~ -182 T ~ 1. intron C ~ 7. intron C ~ 9. exon G ~ 3338 C (rövidítve A~T~C~C~G~C) haplotípushoz képest vannak jelölve, a hibásávok az 95% konfidencia intervallumokat jelzik az ábrán. A leggyakoribb A~T~C~C~G~C haplotípustól (34%, üres kör) szignifikánsan eltért a T~C~T~C~G~C (6%, vörös kör), mely az első 3 SNP-nél különbözik. Tendenciózus különbség látható az A~T~C~C~G~T haplotípusnál (6%, kék kör), mely csupán a 3' végi SNP-ben különbözik. Nem volt szignifikáns különbség a másik két gyakori haplotípusnál (A~T~C~T~A~C, 21%, zöld kör és T~C~C~C~G~C, 17%, rózsaszín kör).

Ezen eredményeink alapján az átlagpopulációs gyerek mintán már csak a NET gén 5' végén elhelyezkedő polimorfizmusokat elemeztük. A CBCL figyelmi zavarok genetikai asszociációit külön vizsgáltuk a klinikai és a nem-klinikai mintákon (3. táblázat).

	Átlagpopulációs gyerek minta N = 88		ADHD-s gyerekek N = 120		gyermekpszichiátriai betegek N = 192	
	N	átlag ± szórás	N	átlag ± szórás	N	átlag ± szórás
rs28386840 (-3081 A/T)						
AA	40	55,80 ± 6,32	71	72,72 ± 8,38	106	70,61 ± 9,31
AT	39	59,10 ± 8,31	43	69,49 ± 7,78	75	66,16 ± 9,16
TT	9	59,00 ± 7,43	6	67,33 ± 9,61	11	66,0 ± 10,95
AT + TT	48	59,08 ± 8,08	49	69,22 ± 7,94	86	66,14 ± 9,33
p érték	0,042		0,023		0,001	
rs2242446 (-182 T/C)						
TT	40	56,05 ± 6,75	68	72,74 ± 8,55	100	70,45 ± 9,46
CT	39	58,85 ± 8,05	43	70,19 ± 7,50	77	66,90 ± 9,28
CC	9	59,00 ± 7,43	9	65,67 ± 8,38	15	65,13 ± 9,64
CT + CC	48	58,88 ± 7,86	52	69,40 ± 7,77	92	66,61 ± 9,31
p érték	0,064		0,020		0,002	
rs3785143 (1. intron C/T) *						
CC	66	56,71 ± 7,02	102	71,65 ± 8,18	158	69,27 ± 9,10
CT	22	60,23 ± 8,30	18	69,28 ± 9,26	34	65,53 ± 11,11
p érték	0,049		0,209		0,030	

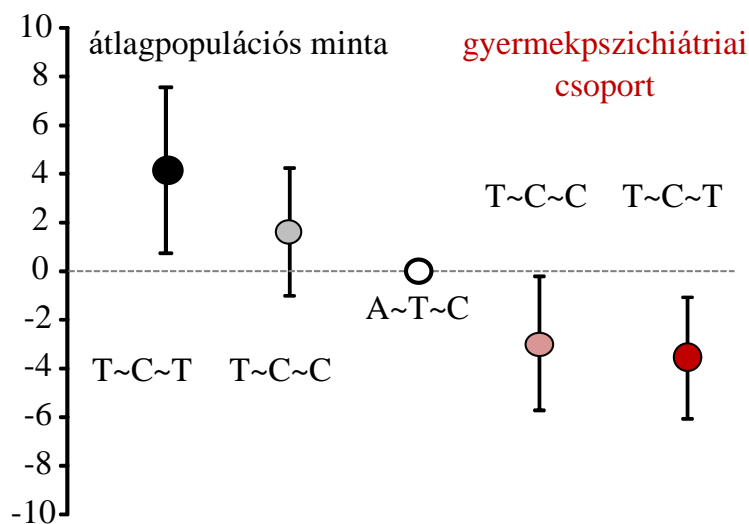
3. táblázat: A NET genetikai asszociáció elemzése a Gyermekviselkedési kérdőív (CBCL) figyelmi zavarok skáláját használva az átlagpopulációs és klinikai mintákban.

A klinikai mintában 120 olyan beteg szerepelt, akiknek ADHD volt az elsődleges vagy másodlagos diagnózisa. A variancia-elemzést egy nagyobb, kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegcsoporton is elvégeztük (n = 192).

* Az 1. intron C/T SNP-nél az átlagpopulációs mintában nem detektáltunk TT homozigótát, és a nagyobb betegcsoportban (N = 192) is csak 2 gyermeknek volt TT genotípusa, ezért itt a TT homozigótákat a CT heterozigótákkal csoportosítottunk. Ahol három genotípuscsoport volt jelen, a ritkább allélt hordozó csoportot a gyakori allélra homozigóta csoporttal hasonlítottuk össze (félkövérrel ábrázolva).

Az ADHD-s betegek körében a két promoter SNP mutatott összefüggést a figyelmi problémákkal (rs28386840: $F(1,116) = 5,33$, $p = 0,023$; rs2242446: $F(1,116) = 5,53$, $p =$

0,020). Hasonló asszociációkat találtunk (nagyobb mértékben) a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegmintában: rs28386840: $F(1,188) = 11,55$, $p = 0,001$; rs2242446: $F(1,188) = 9,40$, $p = 0,002$. Az átlagpopulációs gyerek mintában a promotor régióban található -3081 A/T (rs28386840) és az 1. intron C/T (rs3785143) nominálisan szignifikáns összefüggést mutatott a figyelmi problémákkal ($Z = -2,03$, $p = 0,042$, illetve $Z = -1,97$, $p = 0,049$). Fontos megjegyezni azonban, hogy a genotípuscsoportok különböző mintázatot mutattak a klinikai és az átlagpopulációs mintákban (3. táblázat). A haplotípus elemzést mindhárom vizsgált NET SNP felhasználásával elvégeztük. A -3081 T ~ -182 C ~ 1. intron T (rövidítve T~C~T) haplotípus csoport szignifikánsan magasabb figyelemzavar pontszámokat mutatott az átlagpopulációs mintában, mint a leggyakoribb A~T~C haplotípus csoport ($p = 0,031$, lásd az alapszint fölötti 95%-os CI hibasávokat) (16. ábra).



16. ábra: A Gyermekviselkedési kérdőív (CBCL) figyelmi zavarok átlagos pontszámának különbségei az átlagpopulációs és a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegminták NET haplotípus csoportjainál.

A NET haplotípusok a -3081 A/T, -182 C/T és az 1. intron C/T polimorfizmusokból épülnek fel. A THESIAS program számításai alapján kapott figyelmi problémák pontszám-különbségeit a leggyakoribb -3081 A ~ -182 T ~ 1. intron C (A~T~C) haplotípushoz hasonlítva adtuk meg az y-tengelyen. A hibasávok a 95% konfidencia intervallumokat jelölik az ábrán. A T~C~T (sötét színű) és a T~C~C (világos színű) haplotípus csoportokat a leggyakoribb A~T~C haplotípushoz (üres kör) hasonlítottuk.

Az ADHD-s betegek esetében nem volt szignifikáns különbség a három leggyakoribb haplotípus csoport között (ennek a csoportnak az értékei nincsenek feltüntetve az

ábrán), azonban a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegmintában mind a T~C~C, mind a T~C~T haplotípus csoport szignifikánsan alacsonyabb figyelemzavar tüneteket mutatott, mint az A~T~C haplotípus csoport (T~C~C: $p = 0,031$; T~C~T: $p = 0,005$).

5.3. A noradrenalin transzporter gén polimorfizmusainak elemzése egy prospektív metilfenidát hatékonysági vizsgálatban

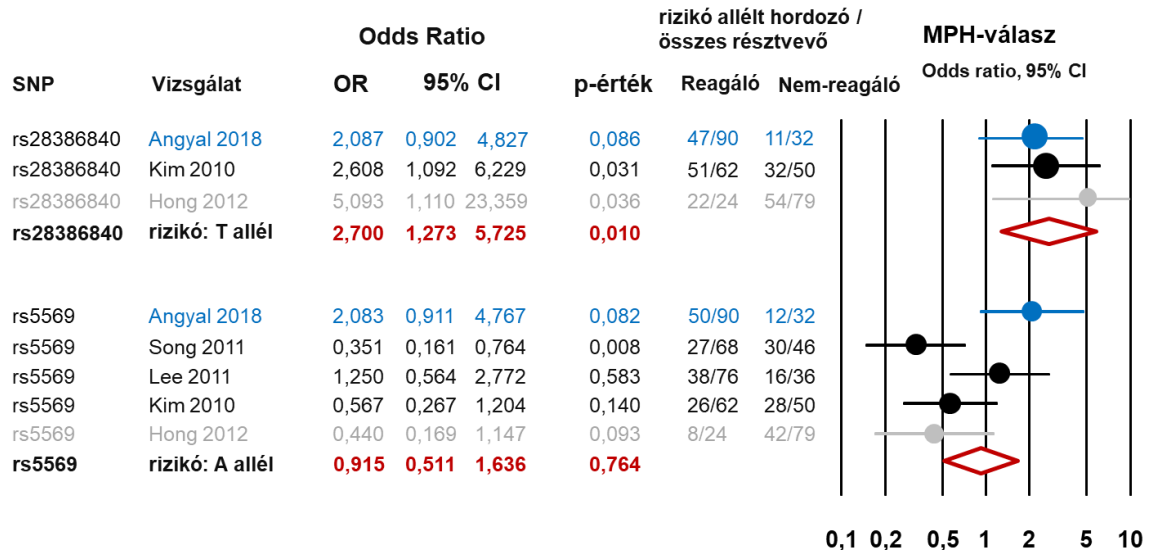
A gyógyszerhatékonyság vizsgálat 122 metilfenidáttal kezelt ADHD-s gyerek bevonásával történt. Az MPH terápia első 4 hónapjában a klinikus és a beteget kísérő szülő tünet-súlyossági kérdőíveket töltött ki, melyek skálaértékein való tünetcsökkenést használtuk fel a gyógyszerre adott válasz jellemzésére (részleteket lásd az 4.1. fejezetben). A kategorikus rendszer szerint 90 gyerek (73,8%) reagált jól a gyógyszerre, míg 32 (26,2%) nem reagált. A χ^2 tesztet elvégezve nem találtunk szignifikáns eltérést a genotípus gyakoriságokban a gyógyszerre reagáló és nem reagáló csoportok között. Tendenciózus különbséget ($0,05 < p < 0,1$) mutatott a -3081 A/T (rs28386840 SNP) és az 1287 A/G (rs5569 SNP, 9. exon) a genotípus szerinti eloszlásokban a két csoport között (4. táblázat a 2 x 2 összehasonlítások p értékeit tartalmazza). A genotípus eloszlások miatt csupán a két promotor SNP esetében volt érdemes a 3 genotípus szerint lefuttatni az elemzéseket, és csak a -3081 A/T SNP esetében láttunk tendencia-szintű különbséget (a 3 genotípus csoportjára: $\chi^2 = 5,69$, $df = 2$, $p = 0,058$).

4. táblázat: A NET gén polimorfizmusainak genotípus eloszlása a metilfenidát kezelésre jól reagáló és nem reagáló ADHD-s gyermek csoportban.

Polimorfizmus	promoter rs28386840 (-3081 A/T)			promoter rs2242446 (-182 C/T)			1. intron rs3785143 (1. intron C/T)			7. intron rs3785157 (7. intron C/T)			9. exon rs5569 (1287 A/G)			3' UTR rs7194256 (3338 C/T)			
	AA	AT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG	CC	CT	TT	
MPH-válasz																			
Nem reagálók	N	21	6	5	5	8	19	26	5	1	20	10	2	2	10	20	21	10	1
	%	65,6	18,8	15,6	15,6	25,0	59,4	81,3	15,6	3,1	62,5	31,3	6,3	6,3	31,3	62,5	65,6	31,3	3,1
Jól reagálók	N	43	38	9	10	40	40	73	17	0	41	41	8	8	42	40	68	21	1
	%	47,8	42,2	10,0	11,1	44,4	44,4	81,1	18,9	0,0	45,6	45,6	8,9	8,9	46,7	44,4	75,6	23,3	1,1
<i>p</i> (df = 1)*		0,082			0,147			0,986			0,100			0,079			0,277		

* az alacsony esetszámok miatt a ritka homozigóták és a heterozigóták összevonásra kerültek

A metilfenidát hatékonyságára vonatkozó eredményeinkkel és az irodalomban publikált adatokkal metaanalízist végeztünk a tendenciózus asszociációt mutató 2 SNP tekintetében (17. ábra). A -3081 A/T (rs28386840) SNP esetében a metaanalízis nominális asszociációt mutatott, míg az 1287 A/G (rs5569) esetében nem találtunk összefüggést.



17. ábra: Az ADHD-s betegek metilfenidát kezelésre adott válaszána metaanalízise a NET rs28386840 és rs5569 genotípus szerinti elemzésben.

Az irodalomban elérhető adatokkal és a saját eredményeinkkel (lásd „Angyal 2018” sor) elvégzett metaanalízis eredménye a promotor -3081 A/T (rs28386840) SNP és a 9. exon 1287 A/G (rs5569) SNP vonatkozásában.

A gyógyszerre jól reagálókat az ADHD-RS tünete súlyossági becslőskála alapján kapott pontszámok csökkenése és/vagy a Clinical Global Impression (CGI) pontszámok javulása alapján határoztuk meg. Nagy eltérés volt a két koreai vizsgálat között: Kim és munkatársai a CGI pontszámok 1-2 ponttal történő javulásával definiálták a gyógyszerre jól reagálókat, aminek eredményeként az ADHD gyermekek 55%-a jól reagáló lett, míg Hong és munkatársai az ADHD-RS pontszámok legalább 50%-os csökkenésével határozták meg ugyanezt, aminek eredményeként a vizsgálatban résztvevők 23%-a lett a metilfenidátra jól reagáló. Mivel az metilfenidát kezelésre általában 60-70%-ban jól reagálnak a betegek, a metaanalízist Hong és munkatársai eredményeit kihagyva újra elvégeztük (Hong és munkatársai eredményeit halványszürke színnel jelöltük). Az analízis eredményei: esélyhányados (OR a felső és alsó CI értékkel): 2,329 (0,868 - 6,253), $z = 1,678$, $p = 0,093$ a -3081 A/T (rs28386840) értéknél, és OR: 0,838 (0,425 -

1,651), $z = -0,512$, $p = 0,609$ a 1287 A/G (rs5569) SNP-nél, tehát a Hong és munkatársai által végzett vizsgálat kihagyása után újra elvégzett metaanalízis nem mutatott szignifikáns eltérést az MPH válaszbán egyik SNP esetében sem.

A metilfenidát hatékonyság tekintetében is végeztük dimenzionális elemzéseket az ADHD-RS tünetsúlyossági értékeivel. A metilfenidát szignifikánsan csökkentette az ADHD tünetsúlyossági értékeket (mind a hiperaktivitási, mind a figyelemhiányos tüneteket) 1 hónapos kezelést követően ($F(1,120) > 200$; $p < 0,001$). A metilfenidát kezelés és az -3081 A/T (rs28386840) SNP interakciót mutatott a hiperaktivitás-impulzivitás értékekkel ($F(1,120) = 4,26$; $p = 0,041$), de a figyelemhiányos tünetekkel nem találtunk összefüggést ($F(1,120) = 1,76$; $p = 0,187$). Feltehetőleg azért, mert ez az SNP már a gyógyszeres kezelést megelőzően is összefüggést mutatott a figyelemhiányos tünetsúlyossági értékekkel ($F(1,120) = 2,84$; $p = 0,094$) a kezelésben résztvevő 122 gyerek esetében. Ez a genetikai különbség látható az ADHD-RS tünetsúlyossági skála összértékében is, de nem érte el a statisztikai szignifikancia határát ($p = 0,080$). A kiindulási és az 1 hónapos kezelés utáni értékek a -3081 A/T (rs28386840) SNP tekintetében az 5. táblázatban találhatóak. A 1287 A/G (rs5569) polimorfizmus nem mutatott összefüggést egyik tünetsúlyossági értékkel sem.

	AA (n=64)	AT (n=44)	TT (n=14)	AT+TT (n=58)
Összérték (kiindulás)	33,78 ± 9,55	32,02 ± 9,37	31,57 ± 10,02	31,91 ± 9,44
Összérték 1 hónap MPH kezelés után	26,59 ± 10,73	22,41 ± 8,74	24,50 ± 10,01	22,91 ± 9,01
Figyelmetlenség (kiindulás)	16,95 ± 4,81	15,36 ± 4,92	15,71 ± 5,62	15,45 ± 5,05
Figyelmetlenség 1 hónap MPH kezelés után	13,28 ± 5,50	10,77 ± 4,85	12,14 ± 4,77	11,10 ± 4,82
Hiperaktivitás-impulzivitás (kiindulás)	16,67 ± 5,98	16,43 ± 5,25	15,86 ± 5,13	16,29 ± 5,18
Hiperaktivitás-impulzivitás 1 hónap MPH kezelés után	13,33 ± 6,10	11,64 ± 4,71	12,50 ± 5,45	11,84 ± 4,86

5. táblázat: Az ADHD tünetsúlyossági skála értékek a NET -3081 A/T (rs28386840) genotípus csoportokban.

A kezelés megkezdése előtti (kiindulás), és az első hónap kezelése utáni ADHD tünetsúlyossági értékek (átlag ± szórás) láthatók a metilfenidát (MPH) kezelésben részt vevő 122 ADHD-s gyermek esetében. Az utolsó oszlopban a T allél hordozók (AT és TT genotípusúak) összevont csoportja látható.

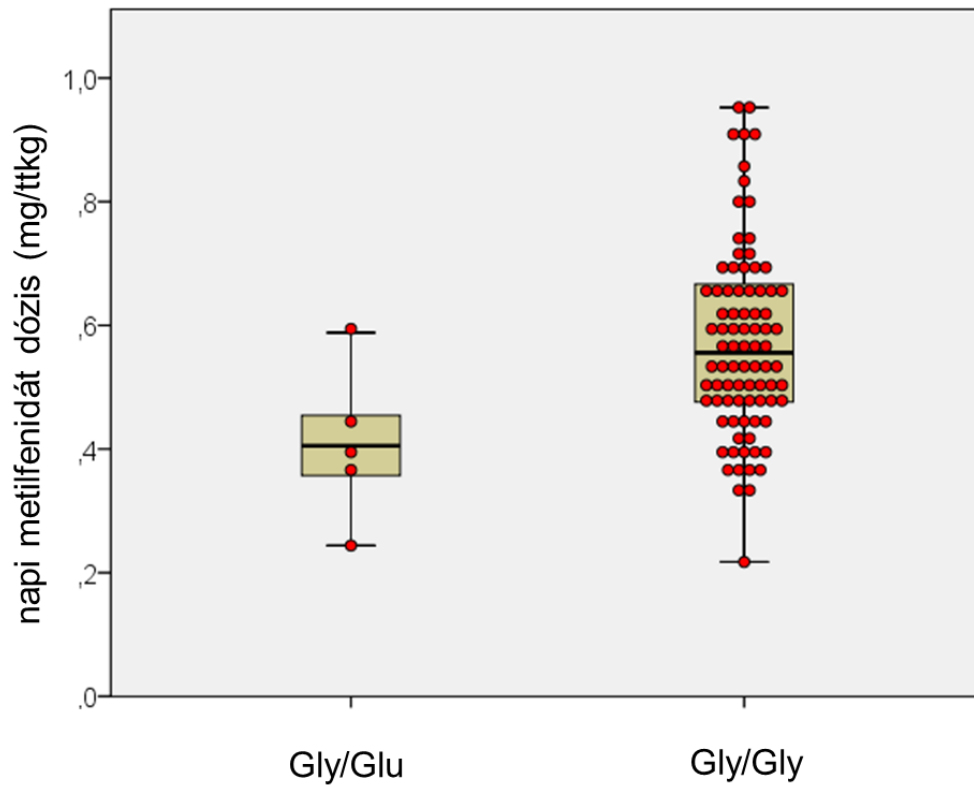
5.4. A karboxilészteráz 1 gén funkcionális polimorfizmusának elemzése a metilfenidát hatékonysági vizsgálatban

A CES1 gén aminosavcserét okozó Gly143Glu (rs71647871) polimorfizmus genetikai vizsgálata során nem találtunk Glu/Glu homozigóta mintát sem a 173 ADHD-val diagnosztizált beteg, sem a 268 kontroll személy mintái között. Az eset-kontroll vizsgálatban nem találtunk szignifikáns eltérést a genotípusok eloszlásában (Pearson $\chi^2 = 0,651$; $df = 1$; $p = 0,42$): Gly/Glu heterozigóták aránya 4,1 % volt a kontroll csoportban (268-ból 11), az ADHD csoportban ez az arány 5,8 % volt (173-ból 10). Az MPH-ra jól és nem reagálók között sem láttunk különbségeket: 5,6 % ill. 6,3 % volt a Gly/Glu heterozigóta genotípus; $\chi^2 = 0,021$; $df = 1$; $p = 0,591$. Végül elvégeztük a dimenzionális elemzést is, hogy értékeljük az MPH hatását az ADHD tünete súlyossági értékekre és elemezzük a CES1 genotípusokkal a lehetséges összefüggéseket. Az MPH természetesen szignifikánsan csökkentette a tüneteket, de a CES1 genotípusoknak nem volt erre kimutatható hatása (6. táblázat).

		ADHD tünete súlyossági becslőskála értékek			
		Figyelemhiányos tünet		Hiperaktivitási tünet	
Genotípus	N	Kiindulás	1 hónap után	Kiindulás	1 hónap után
Gly/Gly	115	16,31 ± 5,00	12,25 ± 5,30	16,37 ± 5,55	12,56 ± 5,60
Gly/Glu	7	15,00 ± 4,32	12,14 ± 5,27	18,57 ± 6,41	13,71 ± 5,41
		$p = 0,272$		$p = 0,37$	

6. táblázat: A CES1 gén Gly143Glu (rs71647871) polimorfizmusának dimenzionális elemzése az ADHD-RS tünete becslőskála eredményei alapján.

Végezetül összevetettük a kívánt terápiás hatás eléréséhez szükséges hatóanyag dózisokat a gyógyszerre reagálók csoportjában. A Gly/Glu heterozigóták esetében ($n = 5$) kevesebb metilfenidátra volt szükség, mint a Gly/Gly homozigóták esetében ($n = 85$). A szükséges átlagos napi dózis a heterozigóták esetében $0,410 \pm 0,127$ mg/kg volt, míg a homozigóták esetében $0,572 \pm 0,153$ mg/kg mennyiségre volt szükség ($t(1,88) = 2,33$; $p = 0,022$).



18. ábra: A terápiás hatás eléréséhez szükséges metilfenidát dózisok a különböző CES1 Gly143Glu genotípus csoportokban.

A metilfenidátra jól reagáló betegek napi metilfenidát dózisát jelölik a piros pontok, a doboz ábra a mediánt és az interkvartilis terjedelmet szemlélteti.

6. Megbeszélés

A komplex öröklődésmentű betegségek genetikai vizsgálatainál kiemelten fontos a megfigyelt összefüggések különböző populációkban való replikációja, hiszen ok-okozati biológiai hatásokról csak akkor beszélhetünk, ha az asszociációk kultúráktól függetlenül is igazolhatók. Molekuláris genetikai munkacsoportunk 2001-ben, a nemzetközi irányvonalakat követve indított el egy ADHD vizsgálatára fókuszáló genetikai kutatást gyermekpszichiáterek és klinikai szakpszichológusok kollaborációjával. A klinikai diagnózis mellett a nemzetközi kutatásban használatos, standardizált kérdőíveket és tünetbecslő skálákat használva 173 ADHD-s gyermeket vontunk be a vizsgálatainkba 2007-ig. Fontos kiemelni, hogy a beteg gyermekek kutatásba való bevonása a Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyv előző verziója (DSM-IV) szerint történt. Mivel a legújabb DSM-5 kritériumrendszer gyermekkori ADHD-t érintő változásai összességében a diagnózis szélesítése irányában változtak (Epstein és Loren 2013), így a kutatásunkban vizsgált gyermekek megfelelnek mind a DSM-IV, mind a DSM-5 kritériumrendszerének.

Kutatási tevékenységem során két fő célkitűzésem volt: a prospektív metilfenidát hatékonysági vizsgálat során összegyűjtött adatok elemzése a lebontó CES1 enzim genetikai variánsa tekintetében, illetve az MPH kevésbé vizsgált célpontjának, a NET génnek asszociáció elemzése mind ADHD-s betegek, mind egy átlagpopulációs gyermek csoport tünete súlyossági jellemzőivel.

6.1. A noradrenalin transzporter gén asszociáció vizsgálata ADHD diagnózissal

A magasabb szintű, összetett viselkedés szabályozásában jelentős prefrontális kéregben az alacsony DAT mennyiségével szemben a NET mennyisége viszonylag magas, továbbá az extracelluláris dopamin felvételében a NET is részt vesz (Moron és mtsai 2002). Ezért azt feltételeztük, hogy a NET expresszióját befolyásoló funkcionális variánsok, úgymint a promoter régióban található polimorfizmusok (pl. rs28386840, Kim és mtsai 2006), avagy a 3' UTR-ben található rs7194256 (Marques és mtsai 2017) hozzájárulhatnak a figyelmi zavarok kialakulásához gyermekkori ADHD-ban. A kórkép gyermekkori populációban való vizsgálata kutatásunk szempontjából azért is releváns, mert a NET agyi expressziója az idő előrehaladtával csökken, ahogy ezt humán (kis elemszámú) PET vizsgálatok alapján feltételezhetjük (lásd egészséges kontroll személyekre vonatkozólag Ding és mtsai 2010, felnőtt ADHD-s betegek esetében pedig

Vanicek és mtsai 2014). A metilfenidát és atomoxetin esetében is igaz, hogy gyermekkorban e gyógyszerek hatáserősségi mutatói a közepes, illetve felső tartományban vannak (0,64 - 0,72), míg felnőttkori ADHD esetében ennél alacsonyabb (0,38 - 0,72) értékek jellemzőek (*Franke és mtsai 2018*, 6. sz. melléklet). Ezeket a klinikai megfigyeléseket állatkísérletek eredményei is alátámasztják, miszerint mind az atomoxetin, mind az MPH kognitív teljesítményt javító hatásánál fontos az életkor (*Bradshaw és mtsai 2016, Bhattacharya és mtsai 2015*). Patkány agy mintákon végzett molekuláris vizsgálatok a noradrenerg neurogenesisben fontos Phox2a és 2b transzkripciós faktorok szerepét valószínűsítik ezekben a folyamatokban (*Zhu és mtsai 2005*).

Munkacsoportunk korábbi, a dopaminerg kandidáns génekre irányuló vizsgálatai után (*Kereszturi és mtsai 2008*) jelen munkám a noradrenerg rendszer vizsgálatát tűzte ki célul. A könnyebb összehasonlíthatóság érdekében olyan SNP-ket választottunk, amelyek korábbi vizsgálatokban már összefüggést mutattak ADHD-val vagy az MPH kezelésre adott válasszal. A replikáció esélyében és a funkcionális hatásban bízva összesen hat SNP-t vizsgáltuk, melyek nagyrészt a NET gén nem-kódoló szakaszain helyezkedtek el. Olyan SNP-ket választottunk, amelyek ritka allél frekvenciája legalább 5%, hiszen a pár százas esetszámunk nem tette lehetővé az igazán ritka változatok releváns statisztikai elemzését.

Előzetes finn populációs adat alapján (*Belfer és mtsai 2004*) arra törekedtünk, hogy lehetőleg különböző haplotípus blokkokból származó SNP-ket válogassunk be vizsgálatainkba. Kapcsoltsági elemzésünk azonban azt mutatta, hogy a vizsgált magyar populációban a 7. intronban található rs3785157 és a 9. exonban lévő rs5569 (1287 A/G szinonim SNP) ugyanahhoz a haploblokkhoz tartozik (lásd 12. ábra). Relatív magas kapcsoltságot láttunk továbbá az 1. intronban lévő rs3785143 és a promoter SNP-k között (magas D' de alacsony r^2 értékek). Elmondhatjuk, hogy az általunk választott polimorfizmusok lefedték a NET gén ADHD diagnózisával összefüggésbe hozott régióit, így lehetővé tették eredményeink összehasonlítását előzetesen publikált adatokkal (*Hawi és mtsai 2013, Kim és mtsai 2006, Kim és mtsai 2008, Yang és mtsai 2004*). Az eset-kontroll elemzéseink nem mutattak összefüggést az ADHD diagnózis és a vizsgált NET polimorfizmusok között (2. táblázat), amit metaanalízisünk is alátámasztott (11. és 12. ábrák).

A NET -3081 A/T SNP és az ADHD diagnózisa közötti potenciális asszociációs kapcsolatot elsőként vizsgáló amerikai kutatócsoport egy riporter génrendszerben is megvizsgálta ezt a génvariánst: a T allél csökkent transzkripciós aktivitását mutatták ki az A allélhez képest (*Kim és mtsai 2006*). Az ADHD diagnózis és a NET -3081 T allél közötti asszociációt később koreai és kanadai vizsgálatok is megerősítették (*Joung és mtsai 2010, Sengupta és mtsai 2012*), míg mások elvetették ezt az összefüggést (*Renner és mtsai 2011*). Kilenc tanulmány eredményein alapuló metaanalízisünk nem mutatott szignifikáns összefüggést a NET -3081 A/T promoter polimorfizmus és az ADHD diagnózis között (11. és 12. ábrák).

A nemzetközi összefogásban létrejött GWAS elemzések eredménye ezzel egybehangzó, ugyanis nem találtak jelentős összefüggést a NET gén gyakori polimorfizmusai és az ADHD diagnózis kapcsolatában. A legújabb GWAS lista ugyan tartalmaz jópár nominális asszociációt ($p < 0,01$) a NET gén egyes régióinál (PGC European Ancestry GWAS adat <https://www.med.unc.edu/pgc>), de ezek nem közelítik meg a genom-szintű elemzés szignifikancia-értékét.

Vizsgálatunk korlátai között szerepel a betegcsoport viszonylag kis elemszáma, a populáció rétegződés lehetősége, melyet nem kontrolláltunk családvizsgálattal. Mivel a nagy elemszámú ($n = 400$) kontroll csoportot fiatal felnőtt átlagpopulációs mintából választottuk ki, így azt csak nemben illesztettük. Az elemzésekhez rendelkezésre álló gyermek kontroll mintánk alacsony elemszáma miatt a nem- és életkori adatok illesztésére nem volt mód, ugyanakkor klinikai jellemzőikre kiemelt figyelmet fordítottunk: az átlagpopulációból származó gyermek minta minden résztvevőjét édesanyjuk által kitöltött, szülői kérdőívvel szűrtük, így a kontroll csoportba csak azok kerültek, akiknél nem állt fenn ADHD diagnózis, sem súlyos figyelmi problémára utaló tünet. Fontos kiemelni, hogy a kétfajta független kontroll csoport genotípus- és allélfrekvencia értékei hasonlóak voltak (lásd 2. táblázat). Mivel a vizsgálati csoportjaink etnikailag homogén kaukázusi populációból származtak, a populációs rétegződés jelentősége elhanyagolható az elemzéseinkben.

A jövőbeli vizsgálatok egyik fő célkitűzése egy még homogénebb és/vagy specifikusabb ADHD altípusú betegcsoportokra osztható minta kialakítása, ennek szükségességére több kutatócsoport felhívta már a figyelmet (*Sengupta és mtsai 2012, Thakur és mtsai 2012*). Az idegrendszer fejlődése alatti (mind *in utero*, mind peri/posztnatális)

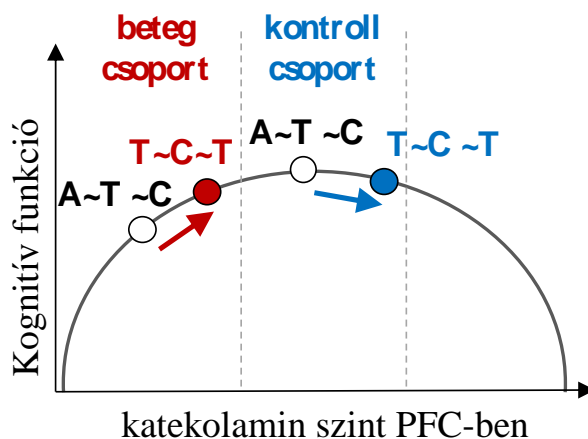
környezeti tényezők figyelembevétele szintén releváns a komplex modellt tesztelő asszociáció elemzésekben. Vizsgálatunkban sajnos nem állt rendelkezésre adat a terhesség alatti környezeti rizikófaktorokról, például az anya dohányzásáról/szerfogyasztásáról, ezért nem tudtuk elvégezni a *Thakur és mtsai (2012)* által közölt alcsoport-specifikus elemzést.

További molekuláris biológiai kísérletek szükségesek a NET gén polimorfizmusaiival, ugyanis egy genetikai szűrőpanelbe csak azokat az SNP-eket érdemes beválasztani, amelyek igazoltan funkcionálisak (a kis hatások miatt ehhez azonban több független munkacsoport kutatási eredményei szükségesek). Végezetül megjegyezném, hogy a kissé eltérő allélfrekvenciák miatt a kaukázusi és ázsiai populációkon végzett vizsgálatok külön-külön metaanalízise lesz majd szükséges, amint elegendő számú, független betegcsoport adata lesz elérhető.

6.2. A noradrenalin transzporter polimorfizmusok asszociáció vizsgálata figyelemzavarral

Az eset-kontroll típusú elemzéseink után egy érzékenyebb, a tünetsúlyossági értékekre épülő varianciaelemzést végeztünk a betegek körében. Először a klinikai gyakorlatban alkalmazott ADHD-RS skála tünetsúlyosságot jellemző pontszámaival futtattunk le elemzéseket, amely pontszámok 163 ADHD-s gyereknél álltak rendelkezésünkre. A figyelemhiányos tünetek súlyossága nominálisan szignifikáns asszociációt mutatott az 1. intron (rs3785143) C/T polimorfizmussal ($p = 0,011$), valamint tendenciózus asszociáció mutatkozott a promoter régióban található -182 C/T (rs2242446) SNP vonatkozásában ($p = 0,055$). A -182 TT és az 1. intron CC genotípusú ADHD-s betegek magasabb átlagos tünetsúlyosságot értek el ezen a skálán (és a -182 CC ill. az 1. intron TT genotípusuk ennek megfelelően alacsonyabb tünetsúlyossági értékeket mutattak). Többszörös tesztelésre korrigálva azonban egyik asszociáció sem maradt szignifikáns (a p értékek magasabbak voltak, mint a 0,008-as határérték). Mégis, a haplotípus elemzésünk - mely a vizsgált hat SNP hatását együtt elemezte - szintén a NET gén 5' UTR polimorfizmusok szerepére mutatott rá, ugyanis annál a haplotípus csoportnál láttunk szignifikánsan alacsonyabb értéket a figyelemhiány tünetskálán, amely a -182 C és az 1 intron T variánsát tartalmazta (a leggyakoribb haplotípushoz hasonlítva: $p = 0,003$, 15. ábra).

Ezek után egy másik, szülő által kitöltött becslőskála, a Gyermekviselkedési Kérdőív (CBCL) figyelemzavar alskáláját használtuk fel varianciaelemzéseinkben. Azt feltételeztük, hogy a potenciálisan funkcionális NET polimorfizmusok a transzporter expresszióját megváltoztatva, a katekolamin szintek kérgi koncentrációját szuboptimális tartományba eltolva figyelmi problémákhoz vezethetnek egészséges gyermekek körében is. Eredményeink a korábbi ADHD-RS skálával végzett varianciaanalízisünkkel azonos tendenciát mutatott, viszont a NET gén 5' végi polimorfizmusai esetében ellentétes hatást mutattak a CBCL figyelmi zavarok skáláján az átlagpopulációs mintában, a gyermekpszichiátriai klinikán toborzott betegcsoporthoz hasonlítva (3. táblázat). Haplotípus elemzésünknel is ellenkező irányú genetikai asszociációt láttunk a figyelmi zavarok tekintetében az átlagpopulációs gyermekmintában, ugyanis esetükben a -3081 T ~ -182 C ~ 1. intron T (rövidítve T~C~T) haplotípus csoport magasabb tünetsúlyossági átlagpontszámot mutatott a leggyakoribb A~T~C haplotípushoz képest ($p = 0,031$, 16. ábra). Ezt az ellentmondást a katekolaminok prefrontális kéregben megfigyelt inverz U alakú hatásgörbéje magyarázhatja, ha ADHD fennállása esetén alacsonyabb alap kortikális katekolamin szintet feltételezünk (19. ábra).



19. ábra: Feltételezett hatásmechanizmus a kétféle NET haplotípussal rendelkező személyeknél a beteg és kontroll csoportban.

A prefrontális kéreg (PFC) optimális katekolamin szint tartományát a két szaggatott vonal közötti terület jelzi (unalmas szituációban vagy álmos állapotban túl kevés, stressz-helyzetben túl sok neurotranszmitter funkcióromláshoz vezet). A noradrenerg rendszer alfa-2A receptorokon keresztül erősíti a hasonló jellegű információkat szállító jeleket a PFC neuronokon, azonban nagy mennyiségű NA egyéb adrenerg (alfa-1 és beta) receptorok aktiválásával rontja a munkamemóriát. A dopaminerg rendszer a zaj csökkentésében játszik szerepet: a D1 receptorok stimulálásával kiszűrődnek a hasznos információval versengő jelek, ami egy ideig növeli a feladatra való koncentrációt,

azonban a túlzott mértékű D1 receptor aktiválódás a feladat elvégzéséhez fontos jelek elvesztéséhez vezet, rontva a teljesítményt.

A NET -3081 T ~ -182 C ~ 1. intron T haplotípus (T~C~T, sötét színnel jelölve) feltehetően magasabb katekolamin szintet eredményez (amiket a nyilak mutatnak) a leggyakoribb A~T~C haplotípushoz (üres kör) képest.

A prefrontális kéreg figyelmi- és végrehajtó funkcióiban a dopamin és a noradrenalin fontos szabályozó szerepet töltenek be. Ezek a katekolaminok egy ún. inverz U alakú hatással bírnak, azaz egy optimális neurotranszmitter koncentráció tartományban legjobb a kognitív teljesítmény (főemlősök agyának elektrofiziológiai mérései alapján legfőképp a D1-típusú dopamin és az alfa-2A adrenerg receptorok stimulálása révén), mind a túl alacsony, mind a túl magas szinaptikus katekolamin szint funkcióromláshoz vezet (*Arnsten és Rubia 2012*).

Klinikai szempontból fontos kiemelni, hogy a tünetbecslő skálák komplex, különböző élethelyzeti szituációkban megjelenő viselkedésekre kérdeznek rá, így a figyelemzavar tünetére irányuló tétel, kognitív szinten megközelítve, a fenntartott figyelmen túl a végrehajtó funkciók egyéb elemeit (szervezést, tervezést, adaptációs készséget) is igénylik. Ezekben a neuronális folyamatokban a kortikális NET szerepére egyelőre csak szelektív gátlószerével, az atomoxetinnel végzett farmakológiai állatkísérletek engednek következtetni, mivel humán képző eljárások csak az utóbbi 15 évben tették lehetővé a NET vizsgálatát (*Ding és mtsai 2006*), és egyelőre csak speciális kortikális régiók (pl. paracentrális lebeny, szupplementer motoros mező) területén tudnak NET sűrűséget mérni (*Hannestad és mtsai 2010*).

A betegek alacsonyabb kortikális szinaptikus katekolamin szintjére az ADHD kezelésében használt gyógyszerek hatásmechanizmusa enged következtetni, mivel a transzporter gátlás, így a szinapszisban lévő katekolamin szint növekedése központi jelentőségű (*Faraone 2019*). A katekolamin transzporter gátló MPH és a szelektív NET gátló atomoxetin hatásossága a figyelmi zavarok csökkentésében, illetve az állatkísérletekben megfigyelt kortikális neuronok aktivitásának optimalizálásában jelentős hatású (*Arnsten és Rubia 2012*). Fontos kiemelni, hogy a túl nagy dózisban adott transzportergátló szer rontja a teljesítményt (az alfa-1 adrenerg receptorok stimulálása, illetve a D1 túlzott stimulálása révén). Egyelőre limitált számú vizsgálat áll rendelkezésre az ADHD-s betegek kortikális régiójára specifikus neurotranszmisszió mérést illetően, elemszámuk is alacsony (*Ulke és mtsai 2019*). A szubkortikális

struktúrákra vonatkozóan is ellentmondásosak az eddigi képalkotó vizsgálatok eredményei (pl. thalamus és cerebellum NET sűrűségi mérések, *Vanicek és mtsai 2014*, *Sigurdardottir és mtsai 2016*, *Ulke és mtsai 2019*).

A 17. ábrán bemutatott modellben a NET -3081 T allélt és -182 C allélt tartalmazó haplotípusnál (T~C~T) csökkent NET transzkripciót és magasabb kortikális katekolamin szintet feltételeztünk, mely javítja a kognitív teljesítményt az ADHD-s betegek körében, ugyanakkor egészséges gyermekek esetében az optimális szint fölé nő a katekolamin szint, így a figyelmi és végrehajtó funkciók romlanak. A NET gén promoter polimorfizmusainak funkcionalitására egyelőre kevés adat áll rendelkezésünkre. A -3081 T allél csökkent transzkripciós hatékonyságot mutatott *in vitro* rendszerben (*Kim és mtsai 2006*), azonban egy (kis elemszámú) *in vivo* vizsgálat során, amelyben pozitron emissziós tomográfiával mérték 20 felnőtt ADHD-s beteg és 20 kontroll személy esetében a szubkortikális NET szinteket, a -3081 T allél ellentétes hatást mutatott a kontroll alanyok thalamus aktivitásában (nem volt különbség a NET sűrűségben az ADHD-s betegek között a NET promoter genotípusok szerint (*Sigurdardottir és mtsai 2016*)). A kérgi területek aktivitását nem mérték a vizsgálatban, így nyitva maradt a kérdés, hogy bármelyik SNP, akár a -3081 A/T, akár a -182 C/T, befolyásolhatja-e a kéregben a NET expressziót.

Megjegyeznénk, hogy ezidáig publikált, szülői kérdőíven alapuló genetikai asszociáció vizsgálatok nem mutattak szignifikáns összefüggést NET polimorfizmusok és a figyelemzavar tekintetében sem ADHD-s betegcsoportban (*Joung és mtsai 2010*, *Park M. H. és mtsai 2012*, *Sengupta és mtsai 2012*), sem átlagpopulációs mintán (*Hohmann és mtsai 2015*), így további elemzések szükségesek független beteg és kontroll mintákon, hogy a NET polimorfizmusok figyelemzavar vonatkozásában betöltött szerepét megerősíthessük. Funkcionális vizsgálatok terén is új, megbízhatóbb eredmények szükségesek a fent vázolt modell alátámasztására.

6.3. Farmakogenetikai vizsgálatok ADHD-s betegek metilfenidát terápiaja során

Az ADHD kezelési stratégiájának célja az alapvető tünetek (figyelemzavar, hiperaktivitás, impulzivitás) és a kapcsolódó funkcionális károsodások javítása. Az ADHD kezelésében fontos szerepe van a beteg készségeit fejlesztő pszichoterápiának, illetve gyermekek esetén a szülő- és pedagógustréningnek. A nemzetközi ADHD irányelvek olyan súlyos és közepesen súlyos tünetekkel rendelkező ADHD-s gyermekek

esetében támogatják a gyógyszeres kezelés alkalmazását, akik esetében nem érhető el megfelelő hatékonyság a pszichoterápiás, illetve készségfejlesztő módszerek alkalmazásával (*Franke és mtsai 2018*, 6. sz. melléklet). Randomizált kontroll vizsgálatok alapján a pszichostimuláns (köztük a metilfenidát) kezelések a legelterjedtebbek. A gyógyszerhatékonysági elemzések szerint az MPH nem csak az ADHD magtüneteit csökkenti, hanem következményesen a betegek által tapasztalt szociális, funkcionális hátrányokat is, így társadalmi szinten az egészségügyi és gazdasági költségek csökkenése irányában hatnak. A magyar ADHD szakmai irányelv a beteg egyedi igényei alapján nyújtott rövid hatású stimuláns gyógyszerek alkalmazását javasolja (*Pászthy és mtsai 2020*). Más országok irányelvei azonban a módosított hatóanyag leadású, így elnyújtott hatású stimulánsok alkalmazását javasolja első választásként, lásd például a brit NICE (National Institute for Health and Care Excellence) kezelési irányelv (*Huss és mtsai 2017*). A klinikai gyakorlatban fontos szempont a gyógyszerhatás és a mindennapi figyelmi tevékenységek időbeli összehangolása, a metilfenidát két kiszérelése közötti választásban pedig a bevétel kivitelezésének körülményei (például, hogy ne kelljen napközben az iskolában gyógyszert bevenni). A farmakoterápia optimalizálása a gyógyszer dózisének titrálásával történik, a kezelés hatékonyságának és tolerálhatóságának biztosítása érdekében rendszeres kontroll vizsgálatok mellett. A legújabb szakmai irányelvek azt javasolják, hogy az MPH adagolását az egyes betegek igényeihez igazítsák (dózisoptimalizálás, dózisindividualizálás vagy rugalmas dózis; 5. sz. melléklet). Fontos megjegyezni, hogy a különböző kezelési irányelvek eltérően rendelkeznek az optimális dózis megállapításáról. Egyes irányelvek az optimális dózist úgy határozzák meg, ami felett már nincs további javulás, míg más irányelvek az optimális terápiás válasz eléréséhez szükséges legalacsonyabb dózis alkalmazását javasolják.

Az MPH kezelésre adott válasz jelentősen eltér a betegek körében a hatás eléréséhez szükséges dózis és a mellékhatások megjelenésének vonatkozásában egyaránt. Prospektív (open-label típusú) MPH hatékonysági vizsgálatunkban betegek 73,8%-a reagált jól a farmakoterápiára, mely egybehangzó a 65-70%-os nemzetközi hatékonysági adatokkal (*Biederman és Spencer 2008*). Az MPH hatásmechanizmusában a DAT gátlása kiemelt jelentőségű, ugyanakkor az aktív D-MPH a noradrenalin transzportert is hatékonyan blokkolja (*Han és Gu 2006*). Régebbi neurobiológiai

elméletek a bazális ganglion (leginkább a striatum) területére lokalizálható dopamin szint növelő hatást tartották központi jelentőségűnek, az újabb eredmények azonban az MPH kettős katekolamin (NA és DA) szint növelő hatását jelzik a prefrontális kéregben. Kiemelendő e tekintetben az ADHD-ban érintett frontostriatális neuronális körök jelentősége, funkcionális kapcsolódásai (*Cubillo és mtsai 2012*).

Elemzéseink során nominálisan szignifikáns különbségeket figyeltünk meg az MPH-ra adott válasszal kapcsolatban: azok az ADHD-s betegek, akik a -3081 A/T (rs28386840) SNP esetében legalább egy T alléllal rendelkeztek, kedvezőbben reagáltak az MPH kezelésre, ami összhangban van korábbi, koreai tanulmányok eredményeivel (*Kim és mtsai 2010, Park és mtsai 2012b*). Tanulmányunkban a hiperaktivitás/impulzivitás tüneteinek csökkenése hasonló volt a Kim és munkatársai (2010) által leírtakhoz. Ezenkívül egy GWAS vizsgálat eredménye összefüggést igazolt az 1. intron régióban elhelyezkedő NET gén SNP-k (rs17841329, rs192303) és az MPH kezelésre adott válasz között (nominális szignifikancia p értékek $\leq 0,01$, *Mick és mtsai 2008*). Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy a diagnosztikai kategóriák helyett a tünete súlyossági mutatók használatával érzékenyebben mutathatók ki az apró genetikai hatások.

Eredményeink publikálása közben jelent meg egy átfogó metaanalízis, amely összesen 36 vizsgálat eredményét dolgozta fel az ADHD kezelésében használt metilfenidát farmakogenetikájával kapcsolatban (*Myer és mtsai 2018*). Ebben a tanulmányban hat kandidáns gén variánsait elemezték. Az általunk is vizsgált NET promotor SNP-k mellett az adrenerg receptor ADRA2A rs1800544, valamint a DAT és DRD4 hosszúság polimorfizmusaival találtak összefüggéseket. A NET -3081 A/T (rs28386840) polimorfizmus esetében hasonló volt metaanalízisünk eredménye a 2017 decemberében megjelent adatokhoz, miszerint a -3081 T allél jobb MPH válasszal mutatott összefüggést (saját metaanalitikus OR: 2,70, CI: 1,27–5,72, Myer és mtsai OR: 2,93, CI: 1,76–4,90). A 9. exon rs5569 (1287 A/G) esetében saját vizsgálatunkban nem mutatkozott szignifikáns asszociáció, míg Myer és mtsai OR: 1,73 (CI: 1,26–2,37, $p = 0,0007$) értéket publikáltak 7 közlemény metaanalízise alapján. Az eltérő eredmények háttéréként két tényező merül fel: saját metaanalízisünkbe csak azokat az eset-kontroll típusú tanulmányokat vontuk be, ahol rendelkezésre állt a jól és nem reagáló allél vagy genotípus szerinti eloszlási adata, míg Myer és mtsai mind a kategorikus, mind a

dimenzionális elemzéseket feldolgozták. Másrészt, saját eredményeink pont az ellenkező irányba mutattak: míg a magyar ADHD betegcsoportban az 1287 A allélt hordozóknál tendenciózusan nagyobb arányban voltak a metilfenidát kezelésre jól reagálók ($p = 0,08$), addig az ázsiai és amerikai vizsgálatok metaanalízisének eredményei szerint a G/G homozigóta betegek reagáltak kedvezőbben MPH-ra. Mivel cikkünk pár hónappal később jelent meg, a magyar adatok nem kerültek bele *Myer és mtsai (2018)* metaanalízisébe. Tekintettel a különböző populációkon kapott eltérő MPH válaszkésztségre, újabb kaukázusi ADHD-s csoportokban végzett vizsgálatok metaanalitikus elemzésétől várható előrelépés, hogy láthassuk melyik NET génvariáns lehet diagnosztikus értékű nemzetközi viszonylatban a metilfenidát hatékonyságának előrejelzésére.

6.4. A metilfenidátot bontó CES1 enzim genetikai vizsgálata

Az ADHD farmakoterápiájában a hatékonyság előrejelzése a klinikai gyakorlatban jelentős lenne, ezért olyan klinikai, biológiai vagy genetikai markereket (úgynevezett biomarkereket) próbálnak azonosítani, amelyek neurobiológiai szinten kapcsolhatók az egyes gyógyszerekre adott válaszkésztségre. Mivel különböző metabolikus utak befolyásolják az eltérő gyógyszertípusok (ADHD esetében a pszichostimuláns MPH és nem-stimuláns atomoxetin) plazmakoncentráció értékét mielőtt azok elérnek a célszervhez, az agyhoz, a gyógyszerelválasztást nagyban segítené egy előzetes, biomarker alapú felmérés. Számos vizsgálatban számoltak be jelentős MPH plazmakoncentráció különbségről ADHD-val kezelt gyerekek esetében egységes dózis beadását követően (*Myer és mtsai 2018*). Mindezek mögött a legerőteljesebb oki tényezőt valószínűleg a gyógyszer bontó enzimek variánsai jelentik. Az atomoxetinnel ellentétben, ami az ADHD kezelésében egy újabb típusú, szelektív NET gátló szer, a gyakrabban alkalmazott MPH metabolizmusának genetikai hátterét illetően limitált számú eredmény áll rendelkezésre feltehetőleg azért, mivel még csak az elmúlt két évtizedben váltak ismertté a lebontó enzimének potenciálisan funkcionális polimorfizmusai.

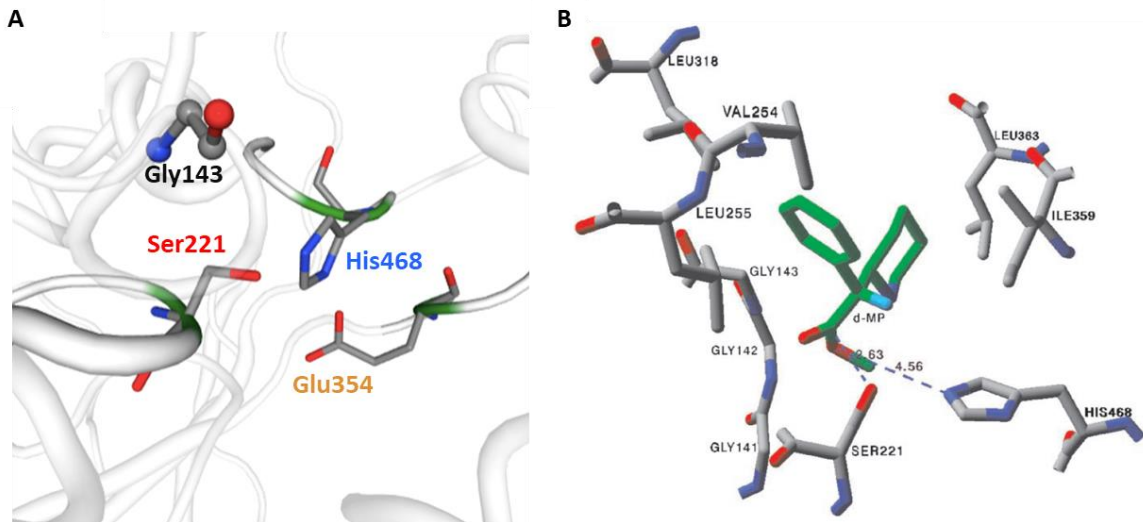
Az atomoxetin a citokróm P450 enzimrendszeren (CYP2D6) keresztül metabolizálódik, amelyet farmakogenetikai aspektusban már régóta vizsgálnak, így az átlagostól lassabb és gyorsabb metabolizmus genetikai háttere relatíve jól feltérképezett (*Michelson és mtsai 2007*). A lassú metabolizálók esetében a tünetek javulása jelentősebb volt, mint a gyors metabolizálóknál, de számos mellékhatás, például csökkent étvágy vagy remegés

is gyakoribb volt az esetükben, feltehetőleg a magasabb plazma atomoxetin koncentráció miatt.

A metilfenidátot bontó CES1 (más néven CES1A1) enzim génjének karakterizálása és szekvenálása során több csökkent enzimaktivitással rendelkező változatot azonosítottak (*Hosokawa és mtsai 1995 és 2008, Zhu és mtsai 2008*). A CES1 gén korábban (2003-ig) leírt SNP-inek egyike sem tekinthető funkcionálisnak, mivel ezek sem a normál, sem a daganatos szövetekben nem társultak megváltozott mRNS szintekhez (*Marsh és mtsai 2004*). Az elmúlt években egyre több tanulmány jelent meg a CES1 gének variánsainak kapcsolatban, de az aktív gén duplikációjával járó változatok nem mutattak eddig szignifikáns eltérést plazma D-MPH koncentráció tekintetében (9. ábra, *Stage és mtsai 2017*), illetve sem az enzim-aktivitásuk, sem génexpressziójuk nem mutatott eltérést máj szövetben (8. ábra, *Shi és mtsai 2016*). Mindkét tanulmány esetében csak a Gly143Glu polimorfizmus esetében találtak összefüggéseket. Érdekes megfigyelés még, hogy egy CES1 promoter változat (rs3815583 G/T), a -75 G allél hordozása esetén az MPH kezelés során súlyosbodtak az étvágytalanságot okozó mellékhatások azon betegeknél, akik korábban nem részesültek stimuláns kezelésben (*Bruxel és mtsai 2013*).

A relatíve ritka Gly143Glu misszensz CES1 variáns funkcionalitására *Zhu és mtsai* hívták fel a figyelmet (5. ábra). E tanulmány alapján választottuk ezt az enzimaktivitást befolyásoló CES1 polimorfizmust (rs71647871 A/G) az MPH hatékonyság farmakogenetikai vizsgálatához. Az említett kutatócsoport által publikált genotipizálási módszert alkalmazva 122 magyar ADHD-s gyermek és 268 kontroll személy mintáin végeztük el elemzéseinket. Tudomásunk szerint ez volt az első publikáció erről a CES1 polimorfizmusról ADHD-val összefüggésben (*Nemoda és mtsai 2009*), ugyanis korábban csak a gyógyszer támadáspontjainak genetikai eltéréseit vizsgálták az MPH-ra adott válasz kapcsán. Asszociáció vizsgálatainkban összefüggést találtunk az MPH hatásossággal: a 143 Glu allélt hordozó betegeknél alacsonyabb MPH dózusra volt szükség a tünetek csökkentéséhez. Mivel ez a CES1 variáns csökkent enzimaktivitással jár, valószínűleg a 143-as Glu variánssal rendelkező betegek aktív MPH plazma koncentrációja magasabb, hasonlóan a lassú metabolizáló CYP2D6 variánst hordozó betegekhez atomoxetin kezelés esetében.

Fontos megemlíteni, hogy emlősökben a katalitikus triád (Ser221, Glu354 és His468, lásd 4. ábra) mellett erősen konzervált a 143-as és az azt megelőző két glicin által kialakított HGGG motívum, mert az általuk alkotott oxianion lyuk elengedhetetlen a karboxilészteráz aktivitáshoz (20. ábra). Ez azért fontos, mert az általunk vizsgált polimorfizmus a 143-as glicint érinti, és ezzel magyarázható a CES1 143 Glutamát állél csökkent enzimaktivitása.



20. ábra: A CES1 enzim katalitikus triádját és az oxianion lyukat alkotó aminosavak szerkezeti képe és reakció mechanizmusa.

20. A: A Gly143 mellett a katalitikus triádot alkotó aminosavak (Ser221, Glu354 és His468) színesen kiemelve a fehérje láncban (a SWISS-MODEL adatbázis <https://swissmodel.expasy.org/templates/5a7h> szerkezeti adatot használva).

20. B: A CES1 enzim által katalizált D-metilfenidát hidrolízise (*Sun és mtsai 2004* alapján). Az MPH molekula (zöld színnel jelölve) H-hidak (szaggatott vonalak) kialakításával kapcsolódik a katalitikus triádot alkotó aminosavakhoz.

Vizsgálatunk limitációi közé tartozik, hogy nem randomizált, placebo-kontrollált (kettős vak) klinikai vizsgálat volt, hanem prospektív (open-label) típusú. A kezdő metilfenidát dózis 5-15 mg volt (testsúlytól függően, fél-egy tableta napi egyszeri vagy kétszeri adagolással). A kezelés hatásosságát fél évig havonta ellenőrizték ambuláns vizitek során, amikor a gyerekek és szülei az újabb adag gyógyszer felírásáért jöttek vizsgálatra. Vizsgálatunk legfőbb korlátja a relatíve alacsony mintaszám volt, ugyanis összesen 7 beteg hordozta a 143 Glu allélt. Ez nem meglepő, mert a ritka variáns előfordulása 1-3% körüli a kaukázusi populációkban. Ezen kívül a hatékony napi dózisok közötti különbség viszonylag kicsi volt (0,410 vs. 0,572 mg/ttkg) és mindössze öt metilfenidátra jól reagáló Gly/Glu genotípusú beteg adatai alapján tudtuk ezt az

eltérést kimutatni. Mindazonáltal eredményeink a CES1 polimorfizmusok szerepére hívják fel a figyelmet a metilfenidát metabolizmusában, melyet további, nagyobb elemszámú betegmintákon végzett vizsgálatoknak kell megerősíteni vagy elvetni. Mivel ezidáig csak a 143 Glu variáns tekintetében számoltak be független tanulmányok konzekvensen enzimaktivitás csökkenésről (*Wang és mtsai 2016, Stage és mtsai 2017*), felmerül, hogy az általunk vizsgált funkcionális CES1 variáns potenciálisan bekerülhet egy egyénre szabott gyógyszerelést segítő genetikai vizsgálati panelbe.

7. Következtetések

Magyar gyermek ADHD betegcsoportban végzett genetikai asszociáció elemzéseink a noradrenalin transzporter gén (NET, SLC6A2) 1. intron C/T (rs3785143) SNP, illetve a vele kapcsoltságban lévő, a gén promoter régiójában található -3081 A/T (rs28386840) és -182 C/T (rs2242446) polimorfizmusok szerepére mutattak rá. Asszociáció vizsgálatainkban a dimenzionális elemzések érzékenyebbek voltak a kis genetikai hatások detektálására, ami a diagnosztikai kategóriákkal szemben a tünetsúlyossági mutatók használatának jelentőségét támasztja alá a pszichogenetika területén. A NET polimorfizmusok asszociációt mutattak (a kiindulási) figyelemzavar súlyosságával mind a klinikai gyakorlatban alkalmazott ADHD-RS, mind a pszichológiai kutatásokban elterjedt Gyermekviselkedés kérdőív (CBCL) figyelemzavar alszáján. Haplotípus elemzésünk is alátámasztotta az említett összefüggést, jelezve a NET gén 5' UTR régió polimorfizmusainak jelentőségét a figyelemzavar tüneteinek hátterében.

Az ADHD terápiájában alkalmazott metilfenidát válasszal összefüggésben végzett farmakogenetikai vizsgálataink is a NET promoter -3081 A/T SNP jelentőségét mutatták, melyet az eddigi nemzetközi publikációkkal végzett metaanalízisünk is alátámasztott. Ezeknél a farmakogenetikai metaanalíziseknél sajnos kevesebb adat áll rendelkezésünkre e polimorfizmus tekintetében, így a saját, közép-európai ADHD csoportban kapott eredményeinket ázsiai (főleg koreai) ADHD vizsgálati eredményekkel vetettük össze. Összefüggést találtunk továbbá a NET gén 5' UTR régió polimorfizmusai és a figyelemzavar között egy 6 éves átlagéletkorú, átlagpopulációból származó gyermek mintán, a genetikai asszociációk ellentétes irányúak voltak a gyermekpszichiátriai betegcsoportban megfigyeltékhez képest. Véleményünk szerint a katekolaminok prefrontális kéregben megfigyelt dózis-függő hatása magyarázhatja eredményeinket, ennek igazolásához azonban további asszociációs és funkcionális vizsgálatok szükségesek.

Végezetül, az ADHD farmakoterápiájában széles körben alkalmazott metilfenidát metabolizmusában fontos enzim, a karboxilészteráz 1 (CES1) funkcionális polimorfizmusa (rs71647871) tekintetében eredményeink azt jelezték, hogy a CES1 143 Glu allélt hordozó betegek esetében alacsonyabb MPH dózisonál észlelhető érdemi tünetcsökkentő hatás. Asszociáció vizsgálataink eredményei a továbbiakban mindenképpen megerősítésre szorulnak nagyobb, független betegmintákon végzett kutatások alapján, tekintettel arra, hogy ez a génvariáns ritka, kb. 1% körüli előfordulást mutat kaukázusi populációkban.

8. Összefoglalás

A figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (ADHD) 5% körülire becsült prevalenciájával az egyik leggyakoribb neurodevelopmentális zavar. A gyermekkorban ADHD-val diagnosztizált betegek jelentős hányadában felnőttkorban is fennmaradhatnak a tünetek. Agyi képalkotó vizsgálatok a bazális ganglionok és a prefrontális kéreg szintjén valószínűsítik dopaminerg ill. katekolaminerg neurotranszmisszió zavart az ADHD neurobiológiai hátterében, ezért a monoamin neurotranszmitter rendszerek a jelenlegi gyógyszeres terápiák célpontjai. Magyarországon a metilfenidát és az atomoxetin került engedélyezésre az ADHD terápiájában. A gyógyszeres kezelésre adott válasz hátterében genetikai meghatározottság is felmerül, ezért az egyénre szabott kezelés kialakítását segítő genetikai vizsgálatok kiemelten fontosak az orvosi gyakorlatban.

Az archivált genetikai mintával rendelkező gyermek ADHD betegcsoportunk alacsony elemszáma (n = 163) kandidáns gének elemzését tette lehetővé. Dolgozatomban a metilfenidát egyik szubsztrátja, a noradrenalin transzporter (NET) és lebontó enzime, a karboxikészteráz 1 (CES1) gyakori génválzatainak asszociáció elemzését mutattam be. Eset-kontroll vizsgálataink nem mutattak összefüggést a kiválasztott NET polimorfizmusok és ADHD diagnózis között, melyet korábbi publikációkat összegző metaanalízisünk is alátámasztott. Dimenzionális megközelítésünkkel azonban asszociációt találtunk a figyelemhiányos tünet súlyossága és a NET gén 5' végi polimorfizmusai között a gyermek ADHD csoportban.

A gyógyszerhatékonysági vizsgálatunkban 122 metilfenidáttal kezelt ADHD beteg vett részt, melyek közül 90 gyerek (73,8%) került a gyógyszerre jól reagálók csoportjába. A vizsgált NET polimorfizmusok közül csupán a funkcionális promoter variáns, a -3081 A/T (rs28386840) SNP mutatott konzekvens összefüggést a tünetcsökkentéssel, melyet ázsiai tanulmányokkal kiegészített metaanalízisünk is alátámasztott. Dimenzionális elemzéseink szerint a -3081 T alléllal rendelkezők reagáltak jobban metilfenidátra az AA genotípusúakhoz képest.

A metilfenidátot bontó CES1 enzim farmakogenetikai elemzése során az aminosav-cserét okozó Gly143Glu (rs71647871) polimorfizmust vizsgáltuk. Nem találtunk különbséget az ADHD tünete súlyosságának csökkentésénél a CES1 genotípus között sem az eset-kontroll, sem a variancia elemzéseinkben. Azonban a kívánt terápiás hatás eléréséhez szükséges hatóanyag dózisokat összevetve a Glu alléllal rendelkezők esetében kevesebb metilfenidátra volt szükség. Ezek a farmakogenetika eredményeink - független betegcsoportok megerősítő vizsgálatait után - hozzájárulhatnak a személyre szabott gyógyszerelés genetikai tesztjeinek kidolgozásához.

9. Summary

Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common neurodevelopmental disorder, with 5% prevalence estimates among school-age children. In a significant portion of ADHD patients, the symptoms persist into adulthood. Several imaging studies reported subtle structural differences in the prefrontal cortex and the basal ganglia regions in children with ADHD. Among the ADHD neurobiological theories, disturbed dopamine and/or norepinephrine systems are the most prominent ones and are targets of current drug therapies. The psychostimulant MPH is the most commonly prescribed drug. Since MPH can compete with both catecholamines at their transporter binding, these transporter genes have been in the center of pharmacogenetic association studies.

Genetic factors determining drug responsiveness have been intensively studied in the last decades in child psychiatry, mostly in connection with MPH response in ADHD treatment, because approximately 65–70% of the patients benefit from MPH treatment. In my thesis, I presented association analyses with common gene variants of the noradrenaline transporter (NET), and its metabolizing enzyme carboxylesterase 1 (CES1). There were no significant differences in the allele or genotype frequencies between 163 ADHD children and control groups at either of the two candidate genes. Meta-analysis of the available case-control studies revealed no significant association either. However, applying dimensional approach, associations were found between the severity of the inattention symptoms and the 5' end polymorphisms of the NET gene in the pediatric ADHD group.

Our pharmacogenetic analyses were conducted with 122 ADHD children receiving MPH treatment, among whom 90 patients (73.8%) were described as responder. Using categorical comparison, we could detect only tendentious associations at two NET polymorphisms, and the metaanalysis confirmed the association only with –3081 A/T (rs28386840) SNP. In the dimensional approach, ADHD patients with at least one –3081 T-allele showed better MPH response compared to patients with AA genotype.

In our association analysis of MPH metabolizing carboxylesterase 1 enzyme (CES1) the Gly143Glu (rs71647871) functional polymorphism was studied. Neither the categorical analysis, nor the dimensional analysis showed a significant main genotype effect. However, analyzing the daily dose, we observed an association, patients with the rare 143 Glu-variant required lower doses of MPH for symptom reduction. These pharmacogenetic results - after confirmatory studies using independent patient groups - may contribute to the development of personalized medicine in ADHD.

10. Irodalomjegyzék

- Achenbach TM, Howell CT, Quay HC, Conners CK. (1991) National survey of problems and competencies among four- to sixteen-year-olds: parents' reports for normative and clinical samples. *Monogr Soc Res Child Dev*, 56: 1-131.
- Akingbuwa WA, Hammerschlag AR, Jami ES, Allegrini AG, Karhunen V, Sallis H, Ask H, Askeland RB, Baselmans B, Diemer E, Hagenbeek FA, Havdahl A, Hottenga JJ, Mbarek H, Rivadeneira F, Tesli M, van Beijsterveldt C, Breen G, Lewis CM, Thapar A, Boomsma DI, Kuja-Halkola R, Reichborn-Kjennerud T, Magnus P, Rimfeld K, Ystrom E, Jarvelin MR, Lichtenstein P, Lundstrom S, Munafo MR, Plomin R, Tiemeier H, Nivard MG, Bartels M, Middeldorp CM, Bipolar D, Major Depressive Disorder Working Groups of the Psychiatric Genomics C. (2020) Genetic Associations Between Childhood Psychopathology and Adult Depression and Associated Traits in 42998 Individuals: A Meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 77: 715-728.
- Angyal N, Horvath EZ, Tarnok Z, Richman MJ, Bognar E, Lakatos K, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2018) Association analysis of norepinephrine transporter polymorphisms and methylphenidate response in ADHD patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 84: 122-128.
- Arnsten AF, Rubia K. (2012) Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 51: 356-367.
- Assary E, Vincent JP, Keers R, Pluess M. (2018) Gene-environment interaction and psychiatric disorders: Review and future directions. *Semin Cell Dev Biol*, 77: 133-143.
- American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders*, Fifth Edition. doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596
- Balázs J., Bíró A., Dalnoki D., Lefkoics E., Tamás Z., Nagy P., & Gádoros J. (2004). The Hungarian Adaptation of the M.I.N.I. KID. *Psychiatr Hung*19, 358-364.
- Banaschewski T, Becker K, Dopfner M, Holtmann M, Rosler M, Romanos M. (2017) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Dtsch Arztebl Int*, 114: 149-159.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21: 263-265.

- Belfer I, Phillips G, Taubman J, Hipp H, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, Goldman D. (2004) Haplotype architecture of the norepinephrine transporter gene SLC6A2 in four populations. *J Hum Genet*, 49: 232-245.
- Bencharit S, Morton CL, Howard-Williams EL, Danks MK, Potter PM, Redinbo MR. (2002) Structural insights into CPT-11 activation by mammalian carboxylesterases. *Nat Struct Biol*, 9: 337-342.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res*, 125: 279-284.
- Bhattacharya SE, Shumsky JS, Waterhouse BD. (2015) Attention enhancing effects of methylphenidate are age-dependent. *Exp Gerontol*, 61: 1-7.
- Biederman J, Spencer TJ. (2008) Psychopharmacological interventions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 17: 439-458, xi.
- Bitter I, Simon V, Balint S, Meszaros A, Czobor P. (2010) How do different diagnostic criteria, age and gender affect the prevalence of attention deficit hyperactivity disorder in adults? An epidemiological study in a Hungarian community sample. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 260: 287-296.
- Bjerre D, Berg Rasmussen H, Indices Consortium (2018) Novel approach for CES1 genotyping: integrating single nucleotide variants and structural variation. *Pharmacogenomics*, 19: 349-359.
- Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De Vrieze F, Arcos-Burgos M, Straub RE, Hardy JA, Castellanos FX, Rapoport JL. (2005) Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 134B: 67-72.
- Bradshaw SE, Agster KL, Waterhouse BD, McGaughy JA. (2016) Age-related changes in prefrontal norepinephrine transporter density: The basis for improved cognitive flexibility after low doses of atomoxetine in adolescent rats. *Brain Res*, 1641: 245-257.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R, Buitelaar J, Sham P, Campbell D, Knight J, Andreou P, Altink M, Arnold R, Boer F, Buschgens C, Butler L, Christiansen H, Feldman L, Fleischman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabriels I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, Muller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barrett R, Craig I, Banaschewski T,

- Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P. (2006) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*, 11: 934-953.
- Bruxel EM, Salatino-Oliveira A, Genro JP, Zeni CP, Polanczyk GV, Chazan R, Rohde LA, Hutz MH. (2013) Association of a carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder treated with methylphenidate. *Pharmacogenomics J*, 13: 476-480.
- Brzezinski MR, Abraham TL, Stone CL, Dean RA, Bosron WF. (1994) Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. *Biochem Pharmacol*, 48: 1747-1755.
- Bybjerg-Grauholm J, Bøcker Pedersen C, Bækvad-Hansen M, Giørtz Pedersen M, Adamsen D, Søholm Hansen C, Agerbo E, Grove J, Als TD, Schork AJ, Buil A, Mors O, Nordentoft M, Werge T, Børghlum AD, Hougaard DM, Mortensen PB. (2020) The iPSYCH2015 Case-Cohort sample: updated directions for unravelling genetic and environmental architectures of severe mental disorders. doi.org/10.1101/2020.11.30.20237768
- Casarotto PC, Giryh M, Fred SM, Kovaleva V, Moliner R, Enkavi G, Biojone C, Cannarozzo C, Sahu MP, Kaurinkoski K, Brunello CA, Steinzeig A, Winkel F, Patil S, Vestring S, Serchov T, Diniz C, Laukkanen L, Cardon I, Antila H, Rog T, Piepponen TP, Bramham CR, Normann C, Lauri SE, Saarma M, Vattulainen I, Castren E. (2021) Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell*, 184: 1299-1313 e1219.
- Casey BJ, Durston S, Fossell JA. (2001): Evidence for a mechanistic model of cognitive control. *Clinical Neuroscience Research*, 1, 267-282
- Challman TD, Lipsky JJ. (2000) Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc*, 75: 711-721.
- Childress A. (2017) The safety of extended-release drug formulations for the treatment of ADHD. *Expert Opin Drug Saf*, 16: 603-615.
- Cortese S, Adamo N, Del Giovane C, Mohr-Jensen C, Hayes AJ, Carucci S, Atkinson LZ, Tessari L, Banaschewski T, Coghill D, Hollis C, Simonoff E, Zuddas A, Barbu C, Purgato M, Steinhausen HC, Shokraneh F, Xia J, Cipriani A. (2018) Comparative

efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Psychiatry*, 5: 727-738.

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2019) Genomic Relationships, Novel Loci, and Pleiotropic Mechanisms across Eight Psychiatric Disorders. *Cell*, 179: 1469-1482 e1411.

Cubillo A, Halari R, Smith A, Taylor E, Rubia K. (2012) A review of fronto-striatal and fronto-cortical brain abnormalities in children and adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and new evidence for dysfunction in adults with ADHD during motivation and attention. *Cortex*, 48: 194-215.

Cuffe SP, Visser SN, Holbrook JR, Danielson ML, Geryk LL, Wolraich ML, McKeown RE. (2020) ADHD and Psychiatric Comorbidity: Functional Outcomes in a School-Based Sample of Children. *J Atten Disord*, 24: 1345-1354.

Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, Baldursson G, Belliveau R, Bybjerg-Grauholm J, Baekvad-Hansen M, Cerrato F, Chambert K, Churchhouse C, Dumont A, Eriksson N, Gandal M, Goldstein JI, Grasby KL, Grove J, Gudmundsson OO, Hansen CS, Hauberg ME, Hollegaard MV, Howrigan DP, Huang H, Maller JB, Martin AR, Martin NG, Moran J, Pallesen J, Palmer DS, Pedersen CB, Pedersen MG, Poterba T, Poulsen JB, Ripke S, Robinson EB, Satterstrom FK, Stefansson H, Stevens C, Turley P, Walters GB, Won H, Wright MJ, ADHD Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (PGC); Early Lifecourse & Genetic Epidemiology (EAGLE) Consortium; 23andMe Research Team, Andreassen OA, Asherson P, Burton CL, Boomsma DI, Cormand B, Dalsgaard S, Franke B, Gelernter J, Geschwind D, Hakonarson H, Haavik J, Kranzler HR, Kuntsi J, Langley K, Lesch KP, Middeldorp C, Reif A, Rohde LA, Roussos P, Schachar R, Sklar P, Sonuga-Barke EJS, Sullivan PF, Thapar A, Tung JY, Waldman ID, Medland SE, Stefansson K, Nordentoft M, Hougaard DM, Werge T, Mors O, Mortensen PB, Daly MJ, Faraone SV, Borglum AD, Neale BM. (2019) Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet*, 51: 63-75.

Ding YS, Lin KS, Logan J. (2006) PET imaging of norepinephrine transporters. *Curr Pharm Des*, 12: 3831-3845.

Dudbridge F. (2008) Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered*, 66: 87-98.

- DuPaul, G.J., Power, T.J., Anastopoulos, A.D., Reid, R., 1998. ADHD Rating Scale-IV: Checklists, Norms, and Clinical Interpretations. Guilford Press, New York.
- Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) A betegségek és az egészséggel kapcsolatos problémák nemzetközi statisztikai osztályozása, Tizedik revízió, BNO-10 (1995) Népjóléti Minisztérium, Budapest
- Elliott J, Johnston A, Husereau D, Kelly SE, Eagles C, Charach A, Hsieh SC, Bai Z, Hossain A, Skidmore B, Tsakonas E, Chojecki D, Mamdani M, Wells GA. (2020) Pharmacologic treatment of attention deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS One*, 15: e0240584.
- Epstein JN, Loren RE. (2013) Changes in the Definition of ADHD in DSM-5: Subtle but Important. *Neuropsychiatry (London)*, 3: 455-458.
- Esteller-Cucala P, Maceda I, Borglum AD, Demontis D, Faraone SV, Cormand B, Lao O. (2020) Genomic analysis of the natural history of attention-deficit/hyperactivity disorder using Neanderthal and ancient Homo sapiens samples. *Sci Rep*, 10: 8622.
- Faraone SV, Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, Rohde LA, Sonuga-Barke EJ, Tannock R, Franke B. (2015) Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 1: 15020.
- Faraone SV, Larsson H. (2019) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 24: 562-575.
- Franke B, Michelini G, Asherson P, Banaschewski T, Bilbow A, Buitelaar JK, Cormand B, Faraone SV, Ginsberg Y, Haavik J, Kuntsi J, Larsson H, Lesch KP, Ramos-Quiroga JA, Rethelyi JM, Ribases M, Reif A. (2018) Live fast, die young? A review on the developmental trajectories of ADHD across the lifespan. *Eur Neuropsychopharmacol*, 28: 1059-1088.
- Frodl T, Skokauskas N. (2012) Meta-analysis of structural MRI studies in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder indicates treatment effects. *Acta Psychiatr Scand*, 125: 114-126.
- Froehlich TE, McGough JJ, Stein MA. (2010) Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs*, 24: 99-117.
- Fuster JM. (1999) Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 395: 51-57.
- Gádoros J. (1996) Szociodemográfiai rizikótényezők vizsgálata gyermek viselkedési kérdőív alkalmazásával. *Psych Hung*, 11:147-166.

- Gatley SJ, Pan D, Chen R, Chaturvedi G, Ding YS. (1996) Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci*, 58: 231-239.
- Gehricke JG, Kruggel F, Thampipop T, Alejo SD, Tatos E, Fallon J, Muftuler LT. (2017) The brain anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder in young adults - a magnetic resonance imaging study. *PLoS One*, 12: e0175433.
- Gervai J, Viselkedésgenetika a humán genom megfejtése előtt és után: kvantitatív és molekuláris genetikai alapok. *Pszichológia*. 2009, 29(1):3-23
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, 126: 51-90.
- Guy, W. (Ed.), 1976. *Clinical Global Impression. ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology*. National Institute of Mental Health.
- Han DD, Gu HH. (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol*, 6: 6.
- Hannestad J, Gallezot JD, Planeta-Wilson B, Lin SF, Williams WA, van Dyck CH, Malison RT, Carson RE, Ding YS. (2010) Clinically relevant doses of methylphenidate significantly occupy norepinephrine transporters in humans in vivo. *Biol Psychiatry*, 68: 854-860.
- Harold GT, Leve LD, Barrett D, Elam K, Neiderhiser JM, Natsuaki MN, Shaw DS, Reiss D, Thapar A. (2013) Biological and rearing mother influences on child ADHD symptoms: revisiting the developmental interface between nature and nurture. *J Child Psychol Psychiatry*, 54: 1038-1046.
- Hawi Z, Matthews N, Barry E, Kirley A, Wagner J, Wallace RH, Heussler HS, Vance A, Gill M, Bellgrove MA. (2013) A high density linkage disequilibrium mapping in 14 noradrenergic genes: evidence of association between SLC6A2, ADRA1B and ADHD. *Psychopharmacology (Berl)*, 225: 895-902.
- Hohmann S, Hohm E, Treutlein J, Blomeyer D, Jennen-Steinmetz C, Schmidt MH, Esser G, Banaschewski T, Brandeis D, Laucht M. (2015) Association of norepinephrine transporter (NET, SLC6A2) genotype with ADHD-related phenotypes: findings of a longitudinal study from birth to adolescence. *Psychiatry Res*, 226: 425-433.
- Hoogman M, Muetzel R, Guimaraes JP, Shumskaya E, Mennes M, Zwiers MP, Jahanshad N, Sudre G, Wolfers T, Earl EA, Soliva Vila JC, Vives-Gilabert Y, Khadka S, Novotny SE, Hartman CA, Heslenfeld DJ, Schweren LJS, Ambrosino S, Oranje B, de Zeeuw P,

Chaim-Avancini TM, Rosa PGP, Zanetti MV, Malpas CB, Kohls G, von Polier GG, Seitz J, Biederman J, Doyle AE, Dale AM, van Erp TGM, Epstein JN, Jernigan TL, Baur-Streubel R, Ziegler GC, Zierhut KC, Schrantee A, Hovik MF, Lundervold AJ, Kelly C, McCarthy H, Skokauskas N, O'Gorman Tuura RL, Calvo A, Lera-Miguel S, Nicolau R, Chantiluke KC, Christakou A, Vance A, Cercignani M, Gabel MC, Asherson P, Baumeister S, Brandeis D, Hohmann S, Bramati IE, Tovar-Moll F, Fallgatter AJ, Kardatzki B, Schwarz L, Anikin A, Baranov A, Gogberashvili T, Kapilushniy D, Solovieva A, El Marroun H, White T, Karkashadze G, Namazova-Baranova L, Ethofer T, Mattos P, Banaschewski T, Coghill D, Plessen KJ, Kuntsi J, Mehta MA, Paloyelis Y, Harrison NA, Bellgrove MA, Silk TJ, Cubillo AI, Rubia K, Lazaro L, Brem S, Walitza S, Frodl T, Zentis M, Castellanos FX, Yoncheva YN, Haavik J, Reneman L, Conzelmann A, Lesch KP, Pauli P, Reif A, Tamm L, Konrad K, Oberwelland Weiss E, Busatto GF, Louza MR, Durston S, Hoekstra PJ, Oosterlaan J, Stevens MC, Ramos-Quiroga JA, Vilarroya O, Fair DA, Nigg JT, Thompson PM, Buitelaar JK, Faraone SV, Shaw P, Tiemeier H, Bralten J, Franke B. (2019) Brain Imaging of the Cortex in ADHD: A Coordinated Analysis of Large-Scale Clinical and Population-Based Samples. *Am J Psychiatry*, 176: 531-542.

Hosokawa M, Endo T, Fujisawa M, Hara S, Iwata N, Sato Y, Satoh T. (1995) Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 23: 1022-1027.

Hosokawa M, Furihata T, Yaginuma Y, Yamamoto N, Watanabe N, Tsukada E, Ohhata Y, Kobayashi K, Satoh T, Chiba K. (2008) Structural organization and characterization of the regulatory element of the human carboxylesterase (CES1A1 and CES1A2) genes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 23: 73-84.

Huss M, Duhan P, Gandhi P, Chen CW, Spannhuth C, Kumar V. (2017) Methylphenidate dose optimization for ADHD treatment: review of safety, efficacy, and clinical necessity. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 13: 1741-1751.

Joel D, Weiner I. (1997) The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Res Brain Res Rev*, 23: 62-78.

Joung Y, Kim CH, Moon J, Jang WS, Yang J, Shin D, Lee S, Kim KS. (2010) Association studies of -3081(A/T) polymorphism of norepinephrine transporter gene with attention

deficit/hyperactivity disorder in Korean population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B: 691-694.

Kereszturi E, Tarnok Z, Bogнар E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. (2008) Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B: 1431-1435.

Kim BN, Kim JW, Hong SB, Cho SC, Shin MS, Yoo HJ. (2010) Possible association of norepinephrine transporter -3081(A/T) polymorphism with methylphenidate response in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct*, 6: 57.

Kim CH, Hahn MK, Joung Y, Anderson SL, Steele AH, Mazei-Robinson MS, Gizer I, Teicher MH, Cohen BM, Robertson D, Waldman ID, Blakely RD, Kim KS. (2006) A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19164-19169.

Kim JW, Biederman J, McGrath CL, Doyle AE, Mick E, Fagerness J, Purcell S, Smoller JW, Sklar P, Faraone SV. (2008) Further evidence of association between two NET single-nucleotide polymorphisms with ADHD. *Mol Psychiatry*, 13: 624-630.

Kim SH, Byeon JY, Kim YH, Lee CM, Lee YJ, Jang CG, Lee SY. (2018) Physiologically based pharmacokinetic modelling of atomoxetine with regard to CYP2D6 genotypes. *Sci Rep*, 8: 12405.

Kooij JJS, Bijlenga D, Salerno L, Jaeschke R, Bitter I, Balazs J, Thome J, Dom G, Kasper S, Nunes Filipe C, Stes S, Mohr P, Leppamaki S, Casas M, Bobes J, McCarthy JM, Richarte V, Kjemps Philipsen A, Pehlivanidis A, Niemela A, Styr B, Semerci B, Bolea-Alamanac B, Edvinsson D, Baeyens D, Wynchank D, Sobanski E, Philipsen A, McNicholas F, Caci H, Mihailescu I, Manor I, Dobrescu I, Saito T, Krause J, Fayyad J, Ramos-Quiroga JA, Foeken K, Rad F, Adamou M, Ohlmeier M, Fitzgerald M, Gill M, Lensing M, Motavalli Mukaddes N, Brudkiewicz P, Gustafsson P, Tani P, Oswald P, Carpentier PJ, De Rossi P, Delorme R, Markovska Simoska S, Pallanti S, Young S, Bejerot S, Lehtonen T, Kustow J, Muller-Sedgwick U, Hirvikoski T, Pironti V, Ginsberg Y, Felegyhazy Z, Garcia-Portilla MP, Asherson P. (2019) Updated European Consensus Statement on diagnosis and treatment of adult ADHD. *Eur Psychiatry*, 56: 14-34.

- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK, Franke B. (2008) Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B: 201-208.
- Krain AL, Castellanos FX. (2006) Brain development and ADHD. *Clin Psychol Rev*, 26: 433-444.
- Lee SH, Kim SW, Lee MG, Yook KH, Greenhill LL, Frandin KN, Hong HJ. (2011) Lack of association between response of OROS-methylphenidate and norepinephrine transporter (SLC6A2) polymorphism in Korean ADHD. *Psychiatry Res*, 186: 338-344.
- Leppert B, Millard LAC, Riglin L, Davey Smith G, Thapar A, Tilling K, Walton E, Stergiakouli E. (2020) A cross-disorder PRS-pheWAS of 5 major psychiatric disorders in UK Biobank. *PLoS Genet*, 16: e1008185.
- Lim HK, Hubbard JW, Midha KK. (1986) Development of enantioselective gas chromatographic quantitation assay for dl-threo-methylphenidate in biological fluids. *J Chromatogr*, 378: 109-123.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461: 747-753.
- Markowitz JS, DeVane CL, Pestreich LK, Patrick KS, Muniz R. (2006) A comprehensive in vitro screening of d-, l-, and dl-threo-methylphenidate: an exploratory study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 16: 687-698.
- Markowitz JS, Straughn AB, Patrick KS, DeVane CL, Pestreich L, Lee J, Wang Y, Muniz R. (2003) Pharmacokinetics of methylphenidate after oral administration of two modified-release formulations in healthy adults. *Clin Pharmacokinet*, 42: 393-401.
- Marques FZ, Eikelis N, Bayles RG, Lambert EA, Straznicki NE, Hering D, Esler MD, Head GA, Barton DA, Schlaich MP, Lambert GW. (2017) A polymorphism in the norepinephrine transporter gene is associated with affective and cardiovascular disease through a microRNA mechanism. *Mol Psychiatry*, 22: 134-141.
- Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR, Kwok PY, McLeod HL. (2004) Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics*, 84: 661-668.
- Martin J, Han C, Gordon LA, Terry A, Prabhakar S, She X, Xie G, Hellsten U, Chan YM, Altherr M, Couronne O, Aerts A, Bajorek E, Black S, Blumer H, Branscomb E, Brown

NC, Bruno WJ, Buckingham JM, Callen DF, Campbell CS, Campbell ML, Campbell EW, Caoile C, Challacombe JF, Chasteen LA, Chertkov O, Chi HC, Christensen M, Clark LM, Cohn JD, Denys M, Detter JC, Dickson M, Dimitrijevic-Bussod M, Escobar J, Fawcett JJ, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Goodwin LA, Grady DL, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Hildebrand CE, Huang W, Israni S, Jett J, Jewett PB, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Krawczyk MC, Leyba T, Longmire JL, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Ludeman T, Manohar CF, Mark GA, McMurray KL, Meincke LJ, Morgan J, Moyzis RK, Mundt MO, Munk AC, Nandkeshwar RD, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Parson-Quintana B, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Ricke DO, Robinson DL, Rodriguez A, Salamov A, Saunders EH, Scott D, Shough T, Stallings RL, Stalvey M, Sutherland RD, Tapia R, Tesmer JG, Thayer N, Thompson LS, Tice H, Torney DC, Tran-Gyamfi M, Tsai M, Ulanovsky LE, Ustaszewska A, Vo N, White PS, Williams AL, Wills PL, Wu JR, Wu K, Yang J, Dejong P, Bruce D, Doggett NA, Deaven L, Schmutz J, Grimwood J, Richardson P, Rokhsar DS, Eichler EE, Gilna P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM, Pennacchio LA. (2004) The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature*, 432: 988-994.

McGough JJ, McCracken JT, Loo SK, Manganiello M, Leung MC, Tietjens JR, Trinh T, Baweja S, Suddath R, Smalley SL, Helleman G, Sugar CA. (2009) A candidate gene analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 48: 1155-1164.

Melegari MG, Bruni O, Sacco R, Barni D, Sette S, Donfrancesco R. (2018) Comorbidity of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Generalized Anxiety Disorder in children and adolescents. *Psychiatry Res*, 270: 780-785.

Mick E, Neale B, Middleton FA, McGough JJ, Faraone SV. (2008) Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B: 1412-1418.

Michelson D, Read HA, Ruff DD, Witcher J, Zhang S, McCracken J. (2007) CYP2D6 and clinical response to atomoxetine in children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 46: 242-251.

Middeldorp CM, Hammerschlag AR, Ouwens KG, Groen-Blokhuis MM, Pourcain BS, Greven CU, Pappa I, Tiesler CMT, Ang W, Nolte IM, Vilor-Tejedor N, Bacelis J, Ebejer JL,

- Zhao H, Davies GE, Ehli EA, Evans DM, Fedko IO, Guxens M, Hottenga JJ, Hudziak JJ, Jugessur A, Kemp JP, Krapohl E, Martin NG, Murcia M, Myhre R, Ormel J, Ring SM, Standl M, Stergiakouli E, Stoltenberg C, Thiering E, Timpson NJ, Trzaskowski M, van der Most PJ, Wang C, Genetics EA, Lifecourse Epidemiology C, Psychiatric Genomics Consortium AWG, Nyholt DR, Medland SE, Neale B, Jacobsson B, Sunyer J, Hartman CA, Whitehouse AJO, Pennell CE, Heinrich J, Plomin R, Smith GD, Tiemeier H, Posthuma D, Boomsma DI. (2016) A Genome-Wide Association Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Population-Based Pediatric Cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 55: 896-905 e896.
- Moffitt TE, Houts R, Asherson P, Belsky DW, Corcoran DL, Hammerle M, Harrington H, Hogan S, Meier MH, Polanczyk GV, Poulton R, Ramrakha S, Sugden K, Williams B, Rohde LA, Caspi A. (2015) Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study. *Am J Psychiatry*, 172: 967-977.
- Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT. (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci*, 22: 389-395.
- Myer NM, Boland JR, Faraone SV. (2018) Pharmacogenetics predictors of methylphenidate efficacy in childhood ADHD. *Mol Psychiatry*, 23: 1929-1936.
- Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch KP, Faraone SV, Nguyen TT, Schafer H, Holmans P, Daly M, Steinhausen HC, Freitag C, Reif A, Renner TJ, Romanos M, Romanos J, Walitza S, Warnke A, Meyer J, Palmason H, Buitelaar J, Vasquez AA, Lambregts-Rommelse N, Gill M, Anney RJ, Langely K, O'Donovan M, Williams N, Owen M, Thapar A, Kent L, Sergeant J, Roeyers H, Mick E, Biederman J, Doyle A, Smalley S, Loo S, Hakonarson H, Elia J, Todorov A, Miranda A, Mulas F, Ebstein RP, Rothenberger A, Banaschewski T, Oades RD, Sonuga-Barke E, McGough J, Nisenbaum L, Middleton F, Hu X, Nelson S, Psychiatric GCAS. (2010) Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49: 884-897.
- Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M. (2009) Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology*, 57: 731-733.

- Nemoda Z, Tárnok Z. Monoamin rendszerek érintettsége gyermekkori neuropszichiátriai zavarokban. *Pszichológia*. 2009, 29(1):43-62
- Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M. (2011) Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neurosci Biobehav Rev*, 35: 1665-1686.
- Newman-Tancredi A, Audinot-Bouchez V, Gobert A, Millan MJ. (1997) Noradrenaline and adrenaline are high affinity agonists at dopamine D4 receptors. *Eur J Pharmacol*, 319: 379-383.
- National Guideline Centre (UK). Attention deficit hyperactivity disorder: diagnosis and management. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE) 2018.
- Oh SY, Kim YK. (2016) Association of norepinephrine transporter gene polymorphisms in attention-deficit/hyperactivity disorder in Korean population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, S0278-5846(16): 30326-30328.
- Paclt I, Pribilova N, Kollarova P, Kohoutova M, Dezortova M, Hajek M, Csemy L. (2016) Reverse asymmetry and changes in brain structural volume of the basal ganglia in ADHD, developmental changes and the impact of stimulant medications. *Neuro Endocrinol Lett*, 37: 29-32.
- Palladino VS, McNeill R, Reif A, Kittel-Schneider S. (2019) Genetic risk factors and gene-environment interactions in adult and childhood attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet*, 29: 63-78.
- Park S, Kim JW, Yang YH, Hong SB, Park MH, Kim BN, Shin MS, Yoo HJ, Cho SC. (2012) Possible effect of norepinephrine transporter polymorphisms on methylphenidate-induced changes in neuropsychological function in attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct*, 8: 22.
- Pászthy B; Balázs J; Ferenci-Dallos Gy; Keresztény Á; Nagy P; Tárnok Zs; Németh A; Bitter I; Balogh L. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma szakmai irányelve a hiperkinetikus zavar (figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar) kórismézéséről, kezeléséről és gondozásáról gyermek, serdülő és felnőttkorban. *Egészségügyi Közlöny*, 2020. 19. szám: 2794–2835.
- Patrick KS, Caldwell RW, Ferris RM, Breese GR. (1987) Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. *J Pharmacol Exp Ther*, 241: 152-158.

- Patrick KS, Corbin TR, Murphy CE. (2014) Ethylphenidate as a selective dopaminergic agonist and methylphenidate-ethanol transesterification biomarker. *J Pharm Sci*, 103: 3834-3842.
- Petrelli F, Dallerac G, Pucci L, Cali C, Zehnder T, Sultan S, Lecca S, Chicca A, Ivanov A, Asensio CS, Gundersen V, Toni N, Knott GW, Magara F, Gertsch J, Kirchhoff F, Deglon N, Giros B, Edwards RH, Mothet JP, Bezzi P. (2020) Dysfunction of homeostatic control of dopamine by astrocytes in the developing prefrontal cortex leads to cognitive impairments. *Mol Psychiatry*, 25: 732-749.
- Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, Bosron WF. (1997) Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J Biol Chem*, 272: 14769-14775.
- Polanczyk GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA. (2014) ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol*, 43: 434-442.
- Quinn PD, Chang Z, Hur K, Gibbons RD, Lahey BB, Rickert ME, Sjolander A, Lichtenstein P, Larsson H, D'Onofrio BM. (2017) ADHD Medication and Substance-Related Problems. *Am J Psychiatry*, 174: 877-885.
- Rasmussen HB, Madsen MB, Indices Consortium (2018) Carboxylesterase 1 genes: systematic review and evaluation of existing genotyping procedures. *Drug Metab Pers Ther*, 33: 3-14.
- Raven JC, 1965. *Guide to Using the Coloured Progressive Matrices*. Lewis, London.
- Reed GM, First MB, Kogan CS, Hyman SE, Gureje O, Gaebel W, Maj M, Stein DJ, Maercker A, Tyrer P, Claudino A, Garralda E, Salvador-Carulla L, Ray R, Saunders JB, Dua T, Poznyak V, Medina-Mora ME, Pike KM, Ayuso-Mateos JL, Kanba S, Keeley JW, Khoury B, Krasnov VN, Kulygina M, Lovell AM, de Jesus Mari J, Maruta T, Matsumoto C, Rebello TJ, Roberts MC, Robles R, Sharan P, Zhao M, Jablensky A, Udomratn P, Rahimi-Movaghar A, Rydelius PA, Bahrer-Kohler S, Watts AD, Saxena S. (2019) Innovations and changes in the ICD-11 classification of mental, behavioural and neurodevelopmental disorders. *World Psychiatry*, 18: 3-19.
- Renner TJ, Nguyen TT, Romanos M, Walitza S, Roser C, Reif A, Schafer H, Warnke A, Gerlach M, Lesch KP. (2011) No evidence for association between a functional

promoter variant of the Norepinephrine Transporter gene SLC6A2 and ADHD in a family-based sample. *Atten Defic Hyperact Disord*, 3: 285-289.

- Réthelyi J, Pulay A, Balogh L, Nemoda Z. (2019) A pszichiátriai genetika új irányai: Genomszintű asszociációs vizsgálatok, poligénes rizikó pontszám és transzdiagnosztikus összehasonlítás. *Psychiatr Hung*, 34: 411-418.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNPMPWG. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928-933.
- Sanghani SP, Sanghani PC, Schiel MA, Bosron WF. (2009) Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3. *Protein Pept Lett*, 16: 1207-1214.
- Satoh T, Hosokawa M. (1998) The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38: 257-288.
- Schwartz S, Correll CU. (2014) Efficacy and safety of atomoxetine in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a comprehensive meta-analysis and metaregression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 53: 174-187.
- Sellers R, Harold GT, Smith AF, Neiderhiser JM, Reiss D, Shaw D, Natsuaki MN, Thapar A, Leve LD. (2019) Disentangling nature from nurture in examining the interplay between parent-child relationships, ADHD, and early academic attainment. *Psychol Med*, 51: 645-652.
- Sengupta SM, Grizenko N, Thakur GA, Bellingham J, DeGuzman R, Robinson S, TerStepanian M, Poloskia A, Shaheen SM, Fortier ME, Choudhry Z, Joobar R. (2012) Differential association between the norepinephrine transporter gene and ADHD: role of sex and subtype. *J Psychiatry Neurosci*, 37: 129-137.
- Shellenberg TP, Stoops WW, Lile JA, Rush CR. (2020) An update on the clinical pharmacology of methylphenidate: therapeutic efficacy, abuse potential and future considerations. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 13: 825-833.

- Shi J, Wang X, Eyler RF, Liang Y, Liu L, Mueller BA, Zhu HJ. (2016) Association of Oseltamivir Activation with Gender and Carboxylesterase 1 Genetic Polymorphisms. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 119: 555-561.
- Shibata F, Takagi Y, Kitajima M, Kuroda T, Omura T. (1993) Molecular cloning and characterization of a human carboxylesterase gene. *Genomics*, 17: 76-82.
- Sigurdardottir HL, Kranz GS, Rami-Mark C, James GM, Vanicek T, Gryglewski G, Kautzky A, Hienert M, Traub-Weidinger T, Mitterhauser M, Wadsak W, Hacker M, Rujescu D, Kasper S, Lanzenberger R. (2016) Effects of norepinephrine transporter gene variants on NET binding in ADHD and healthy controls investigated by PET. *Hum Brain Mapp*, 37: 884-895.
- Song J, Song DH, Jung K, Cheon KA. (2011) Norepinephrine transporter gene (SLC6A2) is involved with methylphenidate response in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, 26: 107-113.
- Srinivas NR, Hubbard JW, Korchinski ED, Midha KK. (1993) Enantioselective pharmacokinetics of dl-threo-methylphenidate in humans. *Pharm Res*, 10: 14-21.
- Srinivas NR, Hubbard JW, Quinn D, Midha KK. (1992) Enantioselective pharmacokinetics and pharmacodynamics of dl-threo-methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Pharmacol Ther*, 52: 561-568.
- Srinivas NR, Quinn D, Hubbard JW, Midha KK. (1987) Stereoselective disposition of methylphenidate in children with attention-deficit disorder. *J Pharmacol Exp Ther*, 241: 300-306.
- Stage C, Jurgens G, Guski LS, Thomsen R, Bjerre D, Ferrero-Miliani L, Lyauk YK, Rasmussen HB, Dalhoff K, Indices Consortium (2017) The impact of CES1 genotypes on the pharmacokinetics of methylphenidate in healthy Danish subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 83: 1506-1514.
- Stein MA, McGough JJ. (2008) The pharmacogenomic era: promise for personalizing attention deficit hyperactivity disorder therapy. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 17: 475-490, xi-xii.
- Stingl JC, Brockmoller J, Viviani R. (2013) Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Mol Psychiatry*, 18: 273-287.
- Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity D, Steering Committee on Quality Improvement and Management, Wolraich M, Brown L, Brown RT, DuPaul G, Earls M,

- Feldman HM, Ganiats TG, Kaplanek B, Meyer B, Perrin J, Pierce K, Reiff M, Stein MT, Visser S. (2011) ADHD: clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Pediatrics*, 128: 1007-1022.
- Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, Bosron WF. (2004) Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. *J Pharmacol Exp Ther*, 310: 469-476.
- Thakur GA, Sengupta SM, Grizenko N, Choudhry Z, Joober R. (2012) Comprehensive phenotype/genotype analyses of the norepinephrine transporter gene (SLC6A2) in ADHD: relation to maternal smoking during pregnancy. *PLoS One*, 7: e49616.
- Thapar A, Cooper M, Eyre O, Langley K. (2013) What have we learnt about the causes of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry*, 54: 3-16.
- Tregouet DA, Garelle V. (2007) A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics*, 23: 1038-1039.
- Tzang RF, Hsu CD, Liou YJ, Hong CJ, Tsai SJ. (2014) Family-based association study of ciliary neurotrophic factor receptor and norepinephrine transporter genes in attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet*, 24: 118-119.
- Ulke C, Rullmann M, Huang J, Luthardt J, Becker GA, Patt M, Meyer PM, Tiepolt S, Hesse S, Sabri O, Strauss M. (2019) Adult attention-deficit/hyperactivity disorder is associated with reduced norepinephrine transporter availability in right attention networks: a (S,S)-O-[(11)C]methylreboxetine positron emission tomography study. *Transl Psychiatry*, 9: 301.
- Vanicek T, Spies M, Rami-Mark C, Savli M, Hoflich A, Kranz GS, Hahn A, Kutzelnigg A, Traub-Weidinger T, Mitterhauser M, Wadsak W, Hacker M, Volkow ND, Kasper S, Lanzenberger R. (2014) The norepinephrine transporter in attention-deficit/hyperactivity disorder investigated with positron emission tomography. *JAMA Psychiatry*, 71: 1340-1349.
- Varga G, Szekely A, Antal P, Sarkozy P, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M. (2012) Additive effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 159B: 281-288.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. (1998) Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry*, 155: 1325-1331.

- Wang D, Zou L, Jin Q, Hou J, Ge G, Yang L. (2018) Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B*, 8: 699-712.
- Wang X, Wang G, Shi J, Aa J, Comas R, Liang Y, Zhu HJ. (2016) CES1 genetic variation affects the activation of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacogenomics J*, 16: 220-230.
- Wang Y, Hu D, Chen W, Xue H, Du Y. (2019) Prenatal Tobacco Exposure Modulated the Association of Genetic variants with Diagnosed ADHD and its symptom domain in children: A Community Based Case-Control Study. *Sci Rep*, 9: 4274.
- Wermter AK, Laucht M, Schimmelmann BG, Banaschewski T, Sonuga-Barke EJ, Rietschel M, Becker K. (2010) From nature versus nurture, via nature and nurture, to gene x environment interaction in mental disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19: 199-210.
- Xu X, Hawi Z, Brookes KJ, Anney R, Bellgrove M, Franke B, Barry E, Chen W, Kuntsi J, Banaschewski T, Buitelaar J, Ebstein R, Fitzgerald M, Miranda A, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Faraone SV, Gill M, Asherson P. (2008) Replication of a rare protective allele in the noradrenaline transporter gene and ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B: 1564-1567.
- Xu X, Knight J, Brookes K, Mill J, Sham P, Craig I, Taylor E, Asherson P. (2005) DNA pooling analysis of 21 norepinephrine transporter gene SNPs with attention deficit hyperactivity disorder: no evidence for association. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 134B: 115-118.
- Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. (2004) Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 43: 1154-1158.
- Yu G, Li GF, Markowitz JS. (2016) Atomoxetine: A Review of Its Pharmacokinetics and Pharmacogenomics Relative to Drug Disposition. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 26: 314-326.
- Zhao H, Nyholt DR. (2017) Gene-based analyses reveal novel genetic overlap and allelic heterogeneity across five major psychiatric disorders. *Hum Genet*, 136: 263-274.
- Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, Malcolm R, Johnson JA, Youngblood GL, Sweet DH, Langaee TY, Markowitz JS. (2008) Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet*, 82: 1241-1248.

- Zhu MY, Wang WP, Iyo AH, Ordway GA, Kim KS. (2005) Age-associated changes in mRNA levels of Phox2, norepinephrine transporter and dopamine beta-hydroxylase in the locus coeruleus and adrenal glands of rats. *J Neurochem*, 94: 828-838.
- Zill P, Engel R, Baghai TC, Juckel G, Frodl T, Muller-Siecheneder F, Zwanzger P, Schule C, Minov C, Behrens S, Rupprecht R, Hegerl U, Moller HJ, Bondy B. (2002) Identification of a naturally occurring polymorphism in the promoter region of the norepinephrine transporter and analysis in major depression. *Neuropsychopharmacology*, 26: 489-493.

11. Saját publikációk jegyzéke**A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:**

Nemoda Z, **Angyal N**, Tarnok Z, Birkas E, Bogнар E, Sasvari-Szekely M, Gervai J, Lakatos K: Differential genetic effect of the norepinephrine transporter promoter polymorphisms on attention problems in clinical and non-clinical samples, FRONTIERS IN NEUROSCIENCE 12: 1051, 6 p. (2019) IF: 3,707

Angyal N, Horvath EZ, Tarnok Z, Richman MJ, Bogнар E, Lakatos K, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z: Association analysis of norepinephrine transporter polymorphisms and methylphenidate response in ADHD patients, PROGRESS IN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY 84: 122-128. (2018) IF: 4,315

Nemoda Z, **Angyal N**, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M: Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD, NEUROPHARMACOLOGY 57(7-8): 731-733. (2009) IF: 3,909

A disszertáció témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk:

Grünblatt E, Nemoda Z, Werling AM, Roth A, **Angyal N**, Tarnok Z, Thomsen H, Peters T, Hinney A, Hebebrand J, Lesch KP, Romanos M, Walitza S: The involvement of the canonical Wnt-signaling receptor LRP5 and LRP6 gene variants with ADHD and sexual dimorphism: Association study and meta-analysis, AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART B-NEUROPSYCHIATRIC GENETICS 180(6): 365-376. (2019) IF: 3,387

Angyal N, Halasz J, Meszaros G, Kovacs JK, Kruk E, Nemoda Z: Potential salivary biomarkers and their genetic effects in a pilot study of adolescent boys with externalizing problems, NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA 18(4): 173-179. (2016)

A disszertáció témájától független publikáció:

Angyal N, Terdy L, Varga Z, Akos K, Bodis A: Nagy hatóanyagtartalmu kapszulazott keszitmeny formulalasa attkristalyositott hatóanyag alkalmazasaval, ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 74(1): 45-50. (2004)

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nemoda Zsófiának, hogy tudásával, hasznos tanácsaival és türelmes segítőkészségével támogatta Ph.D. értekezésem létrejöttét.

Szeretném megköszönni Dr. Balogh Líviának, Dr. Lakatos Krisztinának és Dr. Szabó-Vereczkei Andreának, hogy a Ph.D. időszakom alatt segítették munkámat, és a dolgozatom elkészüléséhez is sok hasznos tanáccsal láttak el.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Doktori Iskola Patobiokémia program volt és jelenlegi vezetőinek, Prof. Mandl Józsefnek és Prof. Csala Miklósnak a lehetőségért, hogy ösztöndíjas hallgatóként végezhettem kutatási munkámat, valamint a Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak a tőlük kapott segítségért. Különösen köszönöm Hantos-Horváth Erzsébet Zsófiának és Németh Helgának, hogy a laboratóriumi munkám során mindvégig segítettek és támogattak.

Végül szeretném megköszönni a támogatást családomnak, főleg férjemnek, hogy megteremtették a lehetőséget a Ph.D. munkámhoz.

12. Mellékletek

1. sz. melléklet: Figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (ADHD) tünetei a Mentális Zavarok Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyve (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM) szerint

Az ADHD altípusokba való besorolás az alább felsorolt 9 figyelemhiányos, valamint 6+3 hiperaktív és impulzív tünet alapján történik (kategóriánként legalább 6 tünetnek kell jelen lennie a 9 felsoroltból).

Figyelmetlenség tünetei:

Gyakran nem figyel megfelelően a részletekre, vagy gondatlan hibákat vét az iskolai és egyéb munkában, illetve más tevékenységben.

Gyakran nehézséget jelent a figyelem megtartása a feladat vagy játék-tevékenységen belül.

Gyakran úgy tűnik, nem figyel, amikor beszélnek hozzá.

Gyakran nem követi az instrukciókat, vagy elmarad az iskolai és egyéb munka, illetve kötelességek stb. befejezésében (nem oppozíciós viselkedés vagy az instrukciók megértési zavara miatt).

Gyakran nehéz a feladatok és a tevékenységek megszervezése.

Gyakran elkerüli, nem szereti, vagy ellenáll, hogy olyan feladatokban vegyen részt, melyek tartós mentális tevékenységet igényelnek.

Gyakran elveszíti a feladatokhoz vagy tevékenységhez szükséges dolgokat (pl. játékokat, iskolai felszerelést, ceruzákat, könyveket vagy szerszámokat).

Gyakran könnyen elvonják a figyelmét külső ingerek.

A napi tevékenységekben gyakran feledékeny.

Hiperaktivitás tünetei:

Gyakran babrál valamivel, kezével matat, lábát váltogatja, az ülésen fészkelődik.

Gyakran elhagyja helyét az osztályban vagy más helyzetekben, ahol az ülve maradáást várják el.

Gyakran rohangál vagy ugrál, mászik olyan helyzetekben, amikor az nem helyénvaló (serdülőknél vagy felnőtteknél ez korlátozódhat a nyugtalanság szubjektív érzéseire).

Gyakran nehézségei vannak az önálló, nyugodt játéktevékenységben vagy az abban való részvételben.

Gyakran „izeg-mozog”, vagy gyakran úgy cselekszik, „mint akit felhúztak”.

Gyakran szertelenül, túlzott mennyiségben beszél.

Impulzivitás tünetei:

Gyakran kimondja a választ, még mielőtt a kérdés befejeződött volna.

Gyakran nehézsége van a várakozással.

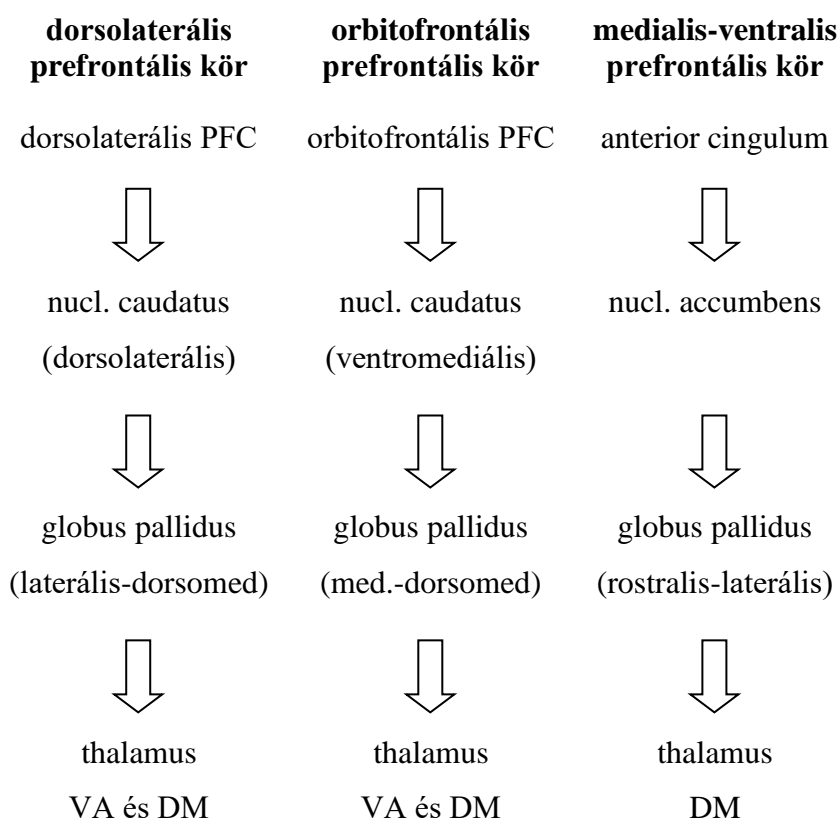
Gyakran félbeszakít másokat (pl. beszélgetéseket vagy játékokat).

2. sz. melléklet: Az ADHD becselő skála szülői változatának tételei (ADHD Rating Scale, ADHD-RS PARENT version)

Az ADHD becselő skálán a szülők (0-1-2-3 pontszámoknak megfelelően) jellemzik gyermekük tüneteinek gyakoriságát, így a 0-27 pontszám érhető el a figyelemhiányos tünetek és a hiperaktív/impulzív tünetek alskálákon.

Milyen mértékben voltak problémái a gyermeknek az utolsó vizit óta?	Soha v. ritkán	Néha	Gyakran	Nagyon gyakran
1. Nem figyel megfelelően a részletekre, vagy figyelmetlenségből hibákat vét az iskolai munkájában	0	1	2	3
2. Izeg-mozog, kezével matat, lábát váltogatja, fészkelődik a széken.	0	1	2	3
3. Nehezen tud koncentrálni a feladatra, vagy a játékra	0	1	2	3
4. Elhagyja a helyét az osztályban, vagy más helyzetekben, amikor ülve kellene maradnia.	0	1	2	3
5. Úgy tűnik, nem figyel, akkor sem, amikor közvetlenül hozzá beszélnek.	0	1	2	3
6. Rohangál, ugrál vagy mászik olyan helyzetekben, amikor az nem való.	0	1	2	3
7. Nem követi az utasításokat és a feladatokat nem fejezi be.	0	1	2	3
8. Nem tud csendben játszani, vagy más szabadidős tevékenységben csendben részt venni.	0	1	2	3
9. Nehézségei vannak a feladatok és a tevékenységek megszervezésében.	0	1	2	3
10. Állandóan "menne", olyan, mint akit "felhúztak".	0	1	2	3
11. Elkerüli azokat a feladatokat /pl. iskolában vagy otthon/, amelyek tartós szellemi erőfeszítést igényelnek.	0	1	2	3
12. Szertelenül beszél.	0	1	2	3
13. Elveszti a feladatokhoz, vagy elfoglaltságokhoz szükséges dolgokat	0	1	2	3
14. Rávágja a választ, mielőtt a kérdést befejezték volna.	0	1	2	3
15. Figyelme könnyen elvonható.	0	1	2	3
16. Nem tud várni a sorára.	0	1	2	3
17. Feledékeny a mindennapi tevékenységei során	0	1	2	3
18. Félbeszakít vagy zavar másokat	0	1	2	3

3. sz. melléklet: A prefrontális kéreg feldolgozókörei (részlet Nemoda és Tárnok 2009 cikkéből)



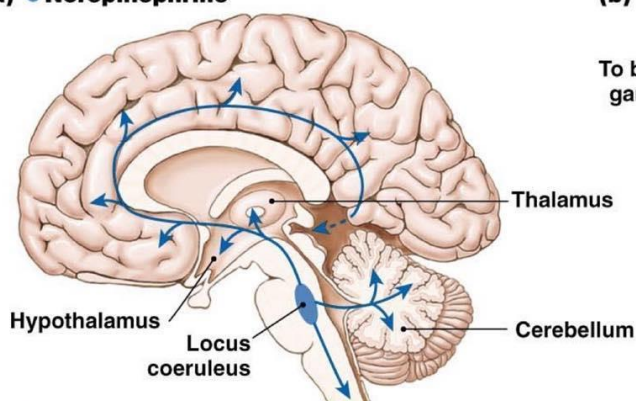
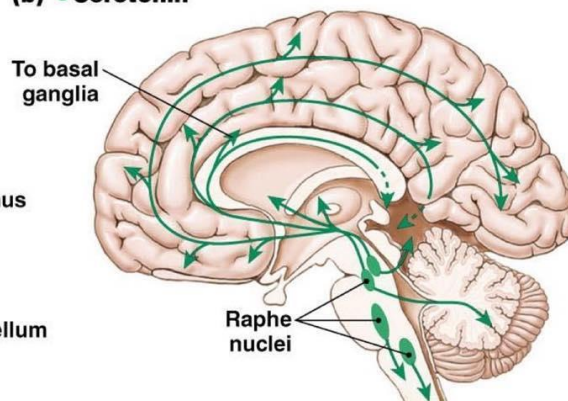
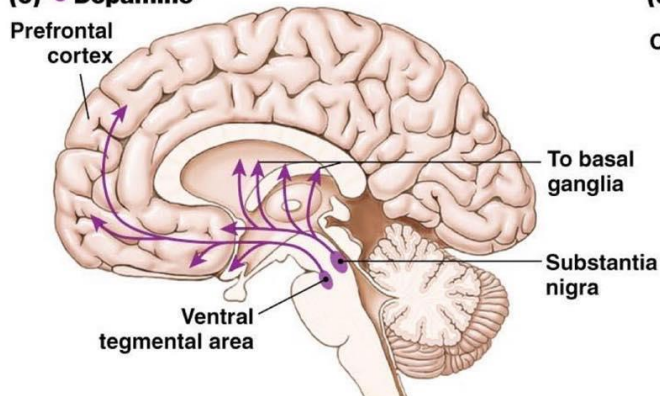
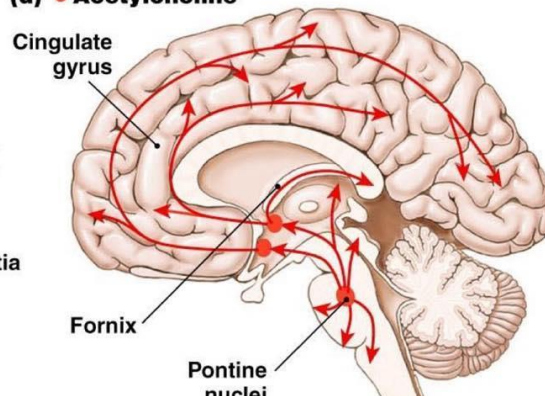
VA: ventroanterior, DM: dorsomedialis

A **dorsolaterális feldolgozókör** a dorsolaterális PFC-ből ered, a nucleus caudatuson, majd a globus palliduson keresztül jut a ventralis anterior és dorsomedialis thalamus magokig, innen tér vissza a dorsolaterális PFC-be. Az úgynevezett dorsolaterális szindróma tulajdonképpen megegyezik a végrehajtó funkciók általános értelemben vett zavarával, vagyis gyengül a hipotézisalkotás, a feladatok tanulása és a konstruktív képesség, munkamemória zavarok léphetnek fel, a gondolkodásban konkretizálást és perszeverációt láthatunk.

A **laterális orbitofrontális kör** az inferolaterális PFC-ből ered, a nucleus caudatuson és a globus palliduson átkapcsolva visszatér az orbitofrontális kéregbe a ventralis anterior és dorsomedialis thalamus magokon keresztül. Az orbitofrontális kör a viselkedésminták tanulásában és kiválasztásában játszik fő szerepet, sérülése a viselkedés organizációjában, az érzelmekkel kapcsolatos döntéshozatalban nyilvánul meg, sokszor szociális és kognitív területekkel kapcsolatos gátlástalanság lép fel.

A **medialis-ventralis kéreg feldolgozóköre** az anterior cinguláris területről ered és a nucleus accumbensbe, valamint a putamen egyes részeibe projektál. A rostralaterális globus palliduson és a thalamus dorsomedialis magján keresztül visszatér az anterior cingulumba. A mediális kéreg feldolgozóköre a motoros aktivitás szervezésében és elindításában játszik szerepet, valamint fontos része az érzelmek és motivációk szabályozásának. Az anterior cingulum kritikus komponense ennek a körnek, mely a téves kimenetelű kognitív folyamatokat felügyeli és korrigálja. Károsodása esetén hangulati zavarok, apátia, az iniciatíva csökkenése és akinetikus mutizmus léphet fel.

4. sz. melléklet: **Monoamin pályák** (Coordination of the Brain Functions, Marieb EN. Human anatomy & physiology 2004, Pearson Education könyv ábráival)

(a) ● **Norepinephrine**(b) ● **Serotonin**(c) ● **Dopamine**(d) ● **Acetylcholine**

Dopaminerg pályák

A dopamin pályarendszerek közül pszichiátriai vonatkozásban legfontosabbak a mesolimbicus és a mesocorticalis pályák, melyek a közepagy ventralis tegmentumából indulnak ki. A mesolimbicus pálya a limbikus rendszerhez (nucleus accumbens, amygdala, hippocampus) vezet, és az ösztönös magatartások, érzelmek, motiváció kialakításában vesz részt. A mesocorticalis pálya a frontális agykéreghez vezet, és a kognitív folyamatokban játszik szerepet. A nigrostriatalis pályarendszer a substantia nigra pars compacta részéből a striatumba vezet és a mozgás-koordinációban van fontos szerepe. A tuberoinfundibuláris dopamin pálya a prolaktin felszabadulást kontrollálja.

Noradrenerg pályák

A központi idegrendszerben a norepinefrin / noradrenalin rendszer az agytörzs locus coeruleus magjából indul ki, beidegezve a kisagyat, a limbikus rendszert (itt a jutalmazási / reward rendszert modulálja) és az agykérget (arousal, ébrenlét).

Szerotonerg pályák

A központi idegrendszerben a szerotonerg rendszer az agytörzs raphe magjaiból kiindulva diffúz összeköttetésben áll a limbikus rendszerrel, az agykéreggel, a bazális ganglionokkal és a kisaggal. Szerepet játszik az érzelmi élet, a testhőmérséklet, a fájdalomérzet és az alvás szabályozásában.

5. sz. melléklet: ADHD gyógyszeres kezelésének irányelve (részletek Pászthy és mtsai 2020 magyar szakmai irányelvéből)

Azon gyermekek, serdülők, illetve felnőttek esetében, akiknél gyógyszeres terápia szükségessége merül fel [középsúlyos ADHD, amennyiben nem reagál nem-gyógyszeres kezelésre, illetve súlyos ADHD (hiperkinetikus zavar)], a NICE (az angol National Institute for Health and Care Excellence) ajánlása alapján elsőként választható szerek az alkalmazási előírásuknak megfelelően az atomoxetine, a dexamfetamine és a metylphenidate. Hazánkban az atomoxetine és a metylphenidate van törzskönyveztve.

A NICE az alábbiak szerint foglalja össze, hogy a klinikusnak milyen szempontokat javasol figyelembevételre, amikor egyik vagy a másik gyógyszer kiválasztásánál dönt:

- a) komorbid kórképek (pl. tik, Tourette zavar, epilepszia) fennállása,
- b) az egyes szerek esetében jelentkező nem kívánatos hatások,
- c) speciális kérdések, mint pl. compliance (pl. szükséges-e napközben, az iskolában gyógyszert bevenni),
- d) a gyógyszer továbbadásának és/vagy az azzal való visszaélésnek a lehetősége (pl. továbbítható-e a gyógyszer másoknak, nem előírászerű használatra),
- e) a gyermek vagy serdülő és/vagy a szülei melyik szert választják inkább.

A NICE leírja, hogy ha több mint egy szer is választható a fentiek alapján, akkor a legalacsonyabb költségűt válassza a klinikus.

Amennyiben, akinek a tünetei alapján szüksége lenne gyógyszeres terápiára (súlyos ADHD), illetve a középsúlyos ADHD nem reagált nem-gyógyszeres terápiára, fontos, hogy a szakember elmagyarázza a gyógyszeres kezelés előnyeit és nagyobb hatékonyságát, mint a nem-gyógyszeres kezelésnek.

A NICE ajánlása szerint methylphenidate kezelés ajánlott olyan hatévesnél idősebb, ADHD diagnózisú gyermekeknél és felnőtteknél, akiknél nem állnak fenn jelentős szorongásos tünetek, agitáció, tik tünetek vagy Tourette szindróma (illetve a családi anamnézisben tik-Tourette zavar), hyperthyreosis, súlyos angina vagy kardiális aritmia, glaukóma, epilepszia, pszichotikus zavar, pszichoaktív szer dependencia.

A methylphenidate adását célszerű úgy időzíteni, hogy hatása egybeessen a legnagyobb szellemi, magatartási és szociális nehézségekkel. A methylphenidate a bevétel után rövid idő múlva (kb. 30 perc) jelentősen csökkenti a hiperaktivitást, figyelemzavar és impulzivitás tüneteit, ezáltal javítja a gyermek szociális készségeit. A methylphenidate rövid hatású készítményének a hatása kb. 4 órát tart. A methylphenidate-kezelést alacsony adagokkal ajánlott kezdeni, amit egy hetes intervallumban javasolt emelni a szükséges szintig (0,6–1,2 mg/kg/nap). A hatékonyságot az egyes dózisemelések kapcsán történő felülvizsgálat alapján kell megítélni. Napi 60 mg-nál nagyobb adag nem javasolt. Általában napi kétszeri bevételre javasolt. A methylphenidate hosszú hatású készítményei is ismertek, melyeket elég napi egyszer bevenni, így a gyermeknek nem kell az iskolában gyógyszert bevenni, hogy egész nap hasson (stigma elkerülése).

Ha a tünetek nem javulnak a dózis beállítása után egy hónappal, a kezelést meg kell szüntetni. Ha a tünetek rosszabbodnak vagy egyéb adverz esemény történik, az adagolást csökkenteni kell, vagy ha szükséges, a gyógyszer alkalmazását meg kell szüntetni.

6. sz. melléklet: ADHD kezelésében használt terápiás módszerek hatáserősségi mutatói gyermekek és felnőttek körében (Franke és mtsai 2018 alapján)

Kezelés és korcsoport	A kezelés típusa	Hatáserősség	Referencia
Gyermekkor: gyógyszeres kezelés	Metilfenidát	0,72	Faraone és Buitelaar (2010)
	Amfetaminok	0,99	Faraone és Buitelaar (2010)
	Atomoxetin	0,64	Schwartz és Correll (2014)
	Guanfacin	0,63	Hirota és mtsai (2014)
	Klonidin	0,44	Hirota és mtsai (2014)
Gyermekkor: nem gyógyszeres kezelés	Omega-3 zsírsavak	0,16	Sonuga-Barke és mtsai (2013)
	Diéta	0,42	Sonuga-Barke és mtsai (2013)
	Neurofeedback	0,21	Hodgson és mtsai (2014)
	Multimodális, pszichoszociális terápia	0,09	Hodgson és mtsai (2014)
	Munkamemória tréning	-0,02 – 0,20	Cortese és mtsai (2015) Hodgson és mtsai (2014)
	Viselkedésterápia	-0,03	Hodgson és mtsai (2014)
	Szülő tréning	-0,51	Hodgson és mtsai (2014)
	Saját teljesítmény monitorozása	-5,91	Hodgson és mtsai (2014)
Pedagógus tréning	-0,26 – 0,16	Hodgson és mtsai (2014) Richardson és mtsai (2015)	
Felnőttkori: gyógyszeres kezelés	Metilfenidát	0,42 – 0,72	Castells és mtsai (2011b) Epstein és mtsai (2014)
	Amfetaminok	0,72 – 1,07	Castells és mtsai (2011a) Fridman és mtsai (2015)
	Atomoxetin	0,38 – 0,60	Asherson és mtsai (2014) Fridman és mtsai (2015)
Felnőttkori: nem gyógyszeres kezelés	Kognitív viselkedésterápia	0,43 – 1,0	Jensen és mtsai (2016) Knouse és mtsai (2017) Young és mtsai (2016)
	Mindfulness alapú terápia	0,53 – 0,66	Cairncross és Miller (2016)