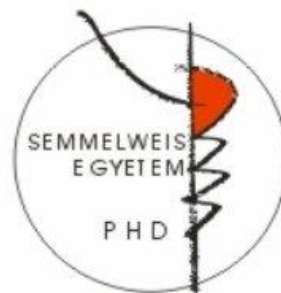


A metilfenidát hatékonyságának farmakogenetikai vizsgálata figyelemhiányos/hiperaktivitás zavarban

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

1. Bevezetés

A **figyelemhiányos/hiperaktivitás zavar (attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD)** az egyik leggyakoribb neurodevelopmentális pszichiátriai zavar; előfordulási gyakorisága 3-6%. A gyermekkorukban ADHD-val diagnosztizált betegek 30-80%-ának tünetei felnőttkorban is fennállnak, ezért korai felismerésük és kezelésük kiemelten fontos a klinikai gyakorlatban. A nemzetközi kutatásokban használt Diagnosztikai és Statisztikai Kézikönyv (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM) három altípust különít el: a figyelemhiányos, a hiperaktív-impulzív és a kombinált típust (ez utóbbi a leggyakoribb).

Család- és ikervizsgálatok nagyfokú genetikai meghatározottságot mutattak ki ADHD-ban, örökölhetőségét ikervizsgálatok alapján 65-80%-ra becsülik. Nagycsaládok genetikai analízise során nyilvánvalóvá vált, hogy feltehetően több génvariáns együttes hatása, illetve környezeti faktorokkal való interakciója vezet a pszichés zavar kialakulásához. A poligénes öröklésment vizsgálatának jelenleg két fő irányvonala van: előzetes hipotézisek alapján kiválasztott kandidáns gének elemzése és a hipotézismentes genom-szintű asszociáció vizsgálatok.

A genom-szintű vizsgálatok hátránya, hogy legalább tízezer beteg és kontroll személy adata szükséges a statisztikailag szignifikáns kis genetikai hatások kimutatására. A legelső genom-szintű ADHD-kutatások – melyek 700-900 ADHD-s gyermek adatait elemezték – csak valószínűsíthető kapcsoltságról számoltak be. Ezért az esetszám növelése érdekében a genetikai kutatásban dolgozók konzorciumokat hoztak létre és metaanalízisek segítségével érték el a megfelelő statisztikai erőt. Az ADHD és a vele átfedő pszichés zavarok vonatkozásában a legutóbbi genom-szintű vizsgálatok eredményei az agy fejlődésében, szinapszisokérésében, neuronok beidegződésében fontos fehérjék génjeire hívták fel a figyelmet.

Az előzetes hipotézisekre épülő **kandidáns gén vizsgálatok** a mai napig fontosak, mivel velük kisebb esetszámú, részletesebben karakterizált (kvantitatív változókkal jellemezhető) betegcsoportokat tudunk vizsgálni. Gyermekkorú ADHD vonatkozásában a jelenlegi neurobiológiai elméletek a bazális ganglionok szabályozó köreinek és a frontális kéreg lassabbérését hangsúlyozzák. Az eddig azonosított strukturális eltérések lokalizációja (mint pl. a gyurus frontalis superior illetve a laterális orbitofrontális gyurus csökkent felszíne) a viselkedés organizációja szempontjából különösen releváns. Az

agytörzs magjaiból induló katekolamin (dopamin és noradrenalin) rendszerek ezekben az agyi régiókban fontos szabályozó szereppel bírnak. A noradrenalin rendszer az éber figyelmi állapot kialakításában kulcsfontosságú. A dopamin neurotranszmisszió pedig a prefrontális kéregbe érkező információk szűrésében (zaj csökkentésében), illetve a bazális ganglionok szintjén a nem megfelelő cselekvések gátlásában játszik szerepet. A legelső kandidáns gének ezért a dopamin rendszer elemeire fókuszáltak, azonban az utóbbi években a noradrenerg rendszer vizsgálata is előtérbe került az ADHD farmakoterápiás vonatkozásai alapján.

Magyarországon két gyógyszer került eddig engedélyezésre az ADHD kezelésében: a pszichostimuláns **metilfenidát** (Ritalin), valamint a nem-stimuláns típusú atomoxetin (Strattera, Bitinex). A metilfenidát dopamin- és noradrenalin transzporter-inhibitor, míg az atomoxetin szelektíven gátolja a noradrenalin transzportert (norepinephrine transporter, NET, SLC6A2). Kiemelendő, hogy míg a bazális ganglionoknál a szinaptikus dopamin neurotranszmissziót a dopamin transzporter (DAT, SLC6A3) hatékonyan terminálja, addig a prefrontális kéregben – ahol a DAT mennyisége alacsony, és a NET mennyisége jelentős – a NET felelős a dopamin visszavételéért is. Hatásmechanizmusuk alapján ezek a gyógyszerek így mindkét katekolamin rendszerre hatnak.

Dolgozatomban az ADHD két kandidáns génjével, a NET-tel és a gyógyszeres kezelésben használt metilfenidát lebontásért felelős karboxilészteráz 1 (CES1) enzimmel végzett asszociáció vizsgálataink eredményeit mutatom be. A gyógyszereket inaktiváló enzimek variánsainak vizsgálata kitüntetetten fontos a jelenlegi genetikai kutatásokban, hiszen személyre szabott gyógyszeres terápiára adhat esélyt már a közeljövőben. A lebontó enzimek genetikai változatai befolyásolhatják a gyógyszer hatékonyságát és az alkalmazott hatásos dózist. Az atomoxetinnel ellentétben, amely a máj citokróm P450 (azon belül is a CYP2D6) enzimrendszeren keresztül metabolizálódik, a metilfenidátot a CES1 enzim alakítja át inaktív ritalinsavvá. A májban termelődő CES1 felelős a metilfenidát D- és L-izomerjének (a Ritalin összetevői) hidrolíziséért és az ebből adódó „first-pass” metabolizmusáért, ezért asszociáció analíziseinkben a metilfenidát hatásos dózist is próbáltuk nyomon követni. Elemzéseinkben a leggyakoribb típusú genetikai variánsokat, az egy pontos nukleotid polimorfizmusokat (single nucleotide polymorphism, SNP) vizsgáltuk, melyeket mind kandidáns gén-, mind genom-szintű asszociáció vizsgálatokban széleskörűen használnak.

2. Célkitűzések

Kutatómunkánk során a **gyermekkori ADHD** genetikai rizikófaktorainak elemzését, valamint a **metilfenidát farmakogenetikájának vizsgálatát** terveztük. 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 gén 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 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 tünet 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.

3. Módszerek

A vizsgálatban résztvevő személyek

Az általunk vizsgált betegcsoport **173 ADHD-val diagnosztizált gyermekből** állt, 87,3%-ban fiúk, átlagéletkoruk $9,14 \pm 2,6$ év volt. A diagnózist a Vadaskert Kórház és Szakambulancián állapították meg, az aktuális Betegségek Nemzetközi Osztályozása (BNO-10) és a kutatásokban széleskörben használt amerikai DSM-IV kritériumrendszer alapján. A tünetek súlyosságának kvantitatív mérőeszközei között szerepelt az ADHD tünetsúlyossági becslőskála (ADHD Rating Scale, ADHD-RS, *DuPaul 1998*), egy klinikai felmérés (Clinical Global Impression - Severity scale, CGI-S, *Guy 1976*) és a Gyermekviselkedési kérdőív szülői változata (Child Behavior Checklist, CBCL, *Achenbach 1991*).

A **metilfenidát hatékonysági vizsgálatban** a fenti **173 ADHD-val diagnosztizált gyermekből 122** vett részt. A kategorikus kritériumrendszer szerint 90 gyermek jól reagált a kezelésre és 32 gyermek került a nem reagálók csoportjába (a nem reagálók esetében kevesebb mint 10%-kal csökkent az ADHD-RS össz-pontszáma két hónapos kezelés után).

A CBCL-kérdőív figyelmi zavarok skálájának elemzésénél egy ún. **kiterjesztett gyermekpszichiátriai csoportot** is használtunk, mely **192 betegből** állt (81,3% fiú; átlagéletkor: $10,0 \pm 3,2$ év). Az elemszám növelése érdekében a 120 ADHD fődiagnózisú beteg mellett 72 krónikus tik zavarral diagnosztizált gyermekeket is bevettünk ebbe a klinikai csoportba.

Az eset-kontroll elemzésekhez kétféle kontroll csoportot használtunk. Az egyik csoportban **400 egészséges fiatal felnőtt** volt (az ún. nemben illesztett kontroll csoport, 87,0% férfi; átlagéletkor: $22,7 \pm 4,2$ év). A másik csoportot a Budapest Családvizsgálatban résztvevő gyermekek közül választottuk, akiknél rendelkezésre állt az édesanya által kitöltött CBCL-adat (Birkás és mtsai 2006). Fontos megemlíteni, hogy ebben a longitudinális, utánkövetéses kutatásban csak egészséges elsőszülött gyerekek vettek részt, mindannyian a 37. terhességi hét után születtek és születési súlyuk minimum 2500 g volt. Két gyermek ADHD diagnózis miatti kizárása után **86 fő** alkotta az ún. **átlagpopulációs gyermek kontroll csoportot** (59,1% fiú; átlagéletkor: $6,3 \pm 0,2$ év).

Genetikai vizsgálatunkat a Helsinki Nyilatkozat irányelvei alapján végeztük el, a kutatási protokollokat a helyi etikai bizottságok hagyták jóvá.

Genotipizálási módszerek

A DNS izolálás szájnyálkahártya mintákból történt. A CES1 gén Gly143Glu (rs71647871) misszensz polimorfizmusát előzetesen közölt primerekkel és allél-specifikus próbákkal, valós idejű (Real-Time) PCR-módszerrel (Zhu és mtsai 2008) genotipizáltuk. A kiválasztott NET polimorfizmusok a következők voltak: enhancer régió: -3081 A/T (rs28386840), promoter régió: -182 C/T (rs2242446); 1. intron C/T (rs3785143); 7. intron C/T (rs3785157); 9. exon A/G (rs5569); és a 3' nem kódoló régióból a 3338 C/T (rs7194256). Ezeket előre tervezett TaqMan SNP-kitek (Applied BioSystem) használatával mértük le.

Genetikai asszociáció analízisek

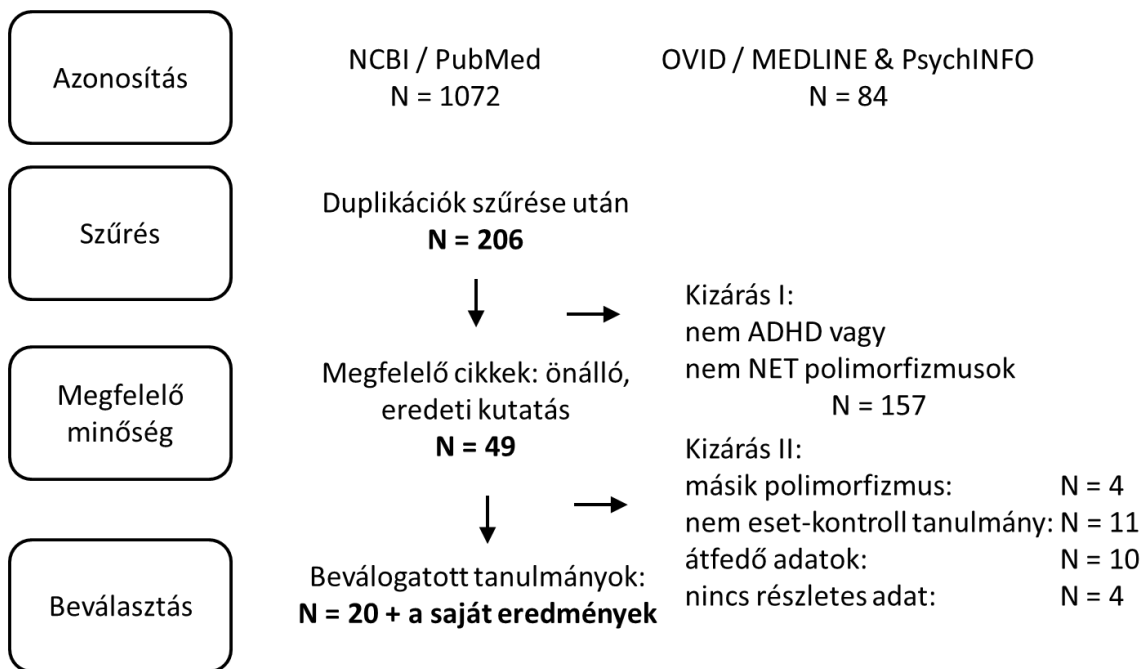
Az eset-kontroll típusú elemzésekhez a χ^2 tesztet használtuk az SPSS statisztikai programmal, míg a haplotípus elemzésekhez az Unphased programot (Dudbridge 2008) futtattuk le. A NET polimorfizmusok kapcsoltóságát a Haploview program felhasználásával ellenőriztük (Barrett és mtsai 2005). A többszörös statisztikai elemzések szignifikancia korrekciójára a False Discovery Rate (Benjamini és mtsai 2001) kalkulációt használtuk, mely figyelembe veszi a független elemzések számát.

A figyelemzavar tüneteinek dimenzionális elemzéséhez az SPSS statisztikai program varianciaanalízisét használtuk 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 gyermek mintában a figyelemzavarra vonatkozó pontszámok normál eloszlástól való eltérése miatt a nem-paraméteres Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk. A becsült haplotípusok asszociáció elemzését a Thesias programmal végeztük (Tregouret és Garelle 2007).

Metaanalízis

Három elektronikus adatbázisban végeztünk irodalomkutatást, az alábbi kulcsszavak kombinációjával: „ADHD / inattention / hyperactivity / hyperkinetic” + “norepinephrine transporter / noradrenaline transporter / SLC6A2 / NET / NAT” + “gene / polymorphism”. A keresés eredményeképpen összesen 1156 angol nyelvű publikációt találtunk 2017 áprilisáig: a PubMed adatbázisában 1072 publikációt, a PsycINFO (Ovid) adatbázisban

ezeiken felül még 38-at, míg a Medline (Ovid) adatbázisában további 46-ot. A folyamatábrán bemutatott kizárások után végül 20 publikáció adata került be a metaanalízisünkbe a saját eredményeink mellett (1. ábra). A metaanalízist a Comprehensive Meta-Analysis szoftver segítségével végeztük (Borenstein és mtsai 2005). A vizsgálati eredményeket az esélyhányados (odds ratio, OR) kiszámításával standardizáltuk (példaként lásd 2. ábra).

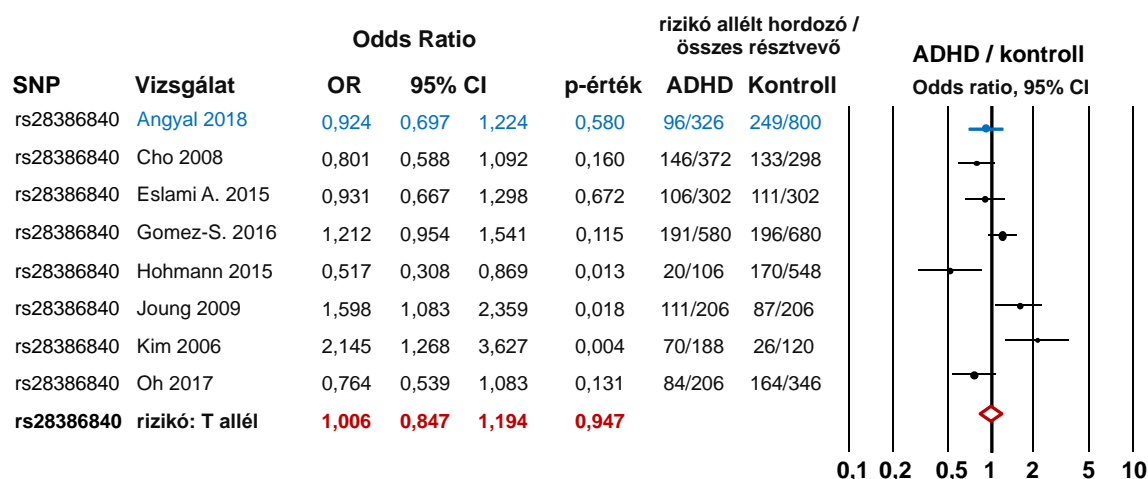


1. ábra: A noradrenalin transzporter polimorfizmusok és az ADHD metaanalízisének folyamatábrája (PRISMA ajánlás alapján).

4. Eredmények

A noradrenalin transzporter polimorfizmusainak asszociáció vizsgálata ADHD-val

Az **eset-kontroll vizsgálataink** egyik vizsgált NET SNP esetében **sem mutattak szignifikáns összefüggést** sem az allél-, sem a genotípus szerinti eloszlásban (p-értékek > 0,1). A haplotípus frekvenciáknál sem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és a betegcsoport adatait összevetve. Ennek nyomán **metaanalízist** végeztünk az irodalomban elérhető eset-kontroll vizsgálatok felhasználásával, ami alátámasztotta negatív eredményeinket, példaként a enhancer régió -3081 A/T (rs28386840) SNP adatait mutatom be a 2. ábrán.



2. ábra: A NET -3081 A/T (rs28386840) SNP és az ADHD diagnózis eset-kontroll vizsgálatainak metaanalízise a rizikó (minor) allél hordozás szerint.

Az esélyhányados (odds ratio, OR) értékek és a 95%-os konfidencia intervallum (CI) alsó és felső határértékei számmal az első oszlopokban, grafikusan az ábra jobb oldalán láthatók. Saját vizsgálatunkat kékkel emeltük ki. Az összegzett OR nagyságát a vörös rombusz jelzi.

A noradrenalin transzporter polimorfizmusok asszociáció vizsgálata figyelemzavarral

Dimenzionális elemzéseinkben a ritka homozigóta és heterozigóta személyeket összevontuk a statisztikai erő növelése érdekében. Egy nominálisan szignifikáns összefüggést találtunk a szülő által kitöltött tünetsúlyossági becslőskála (ADHD-RS kérdőív) **figyelemhiányos tünetek** súlyossága és a NET 1. intron C/T (rs3785143) SNP között: a T allélt hordozó csoportnak alacsonyabb értéke volt a CC homozigótákhoz

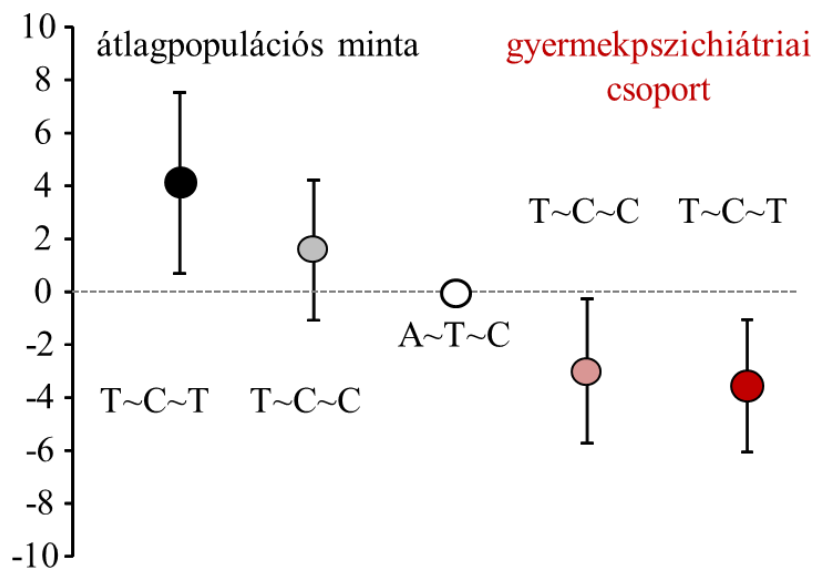
képeket (CC: $16,28 \pm 4,67$; CT + TT: $13,88 \pm 5,15$; $F(1,161) = 6,57$; $p = 0,011$). A promoter régióban található -182 C/T (rs2242446) polimorfizmus pedig tendencia szintű asszociációt mutatott a figyelemhiányos tünetek súlyosságával: a C allélt hordozóknak volt átlagosan alacsonyabb pontszámuk (CC + CT: $15,10 \pm 4,92$; TT: $16,55 \pm 4,68$, $F(1,161) = 3,73$; $p = 0,055$). Többszörös tesztre korrigálva azonban egyik megfigyelt asszociáció sem maradt szignifikáns (a vizsgált hat SNP egyikénél sem lett alacsonyabb az asszociáció p-értéke mint 0,008).

A NET SNP-k **haplotípus elemzésénél** 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 a **T~C~T~C~G~C** haplotípussal rendelkező betegcsoport mutatott szignifikánsan alacsonyabb ADHD-RS figyelemhiányos tünet értéket ($p = 0,003$), jelezvén, hogy az 5' végi polimorfizmusok szerepet játszhatnak a tünetek kialakulásában. Az egyéb haplotípusokkal rendelkező csoport rendre alacsonyabb pontszámot mutatott a leggyakoribb haplotípushoz hasonlítva, de ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak.

A **Gyermekviselkedési (CBCL) kérdőív figyelmi zavarok genetikai asszociációit** külön vizsgáltuk a klinikai és a nem-klinikai (átlagpopulációból származó) gyermek mintákon. A kezelés megkezdése előtt (baseline állapotban) az ADHD-s betegek körében az enhancer és a promoter SNP mutatott összefüggést a figyelmi problémákkal (-3081 A/T: $F(1,116) = 5,33$, $p = 0,023$; -182 C/T: $F(1,116) = 5,53$, $p = 0,020$). Hasonló, de erőteljesebb asszociációt találtunk a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegmintában (-3081 A/T: $F(1,188) = 11,55$, $p = 0,001$; -182 C/T: $F(1,188) = 9,40$, $p = 0,002$).

Az átlagpopulációból származó gyermek mintában a enhancer 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.

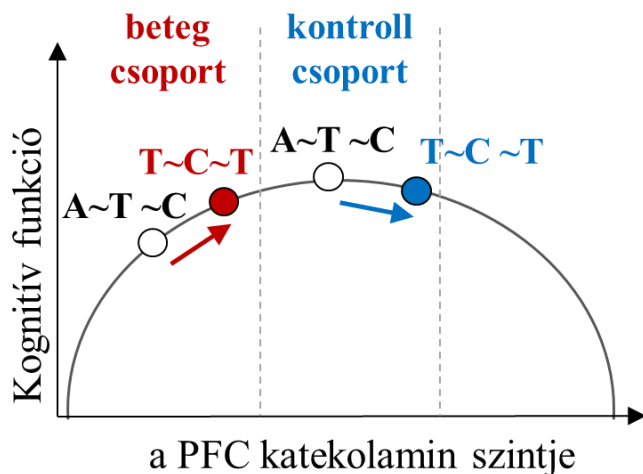
Haplotípus elemzésünket az asszociációt mutató három NET SNP felhasználásával végeztük el (3. ábra). A **-3081 T ~ -182 C ~ 1. intron T** (T~C~T) haplotípus csoport szignifikánsan magasabb figyelemzavar pontszámot mutatott az átlagpopulációból származó mintában, mint a leggyakoribb A~T~C haplotípus csoport ($p = 0,031$).



3. ábra: A NET haplotípus csoportok Gyermekviselkedési (CBCL) kérdőív alapján felvett figyelmi zavar pontszámainak különbségei (95% konfidencia-intervallummal) az átlagpopulációs és a kiterjesztett gyermekpszichiátriai betegmintákban. A -3081 T ~ -182 C ~ 1. intron T haplotípus (sötét színnel jelölve, T~C~T) és a T~C~C haplotípus (világos színnel jelölve) a leggyakoribb A~T~C haplotípushoz (üres kör) hasonlítva.

Az ADHD-s betegek esetében nem volt szignifikáns különbség a három leggyakoribb NET haplotípus csoport között, 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: $p = 0,005$).

Ezt a látszólagos ellentmondást a katekolaminok prefrontális kéregben megfigyelt inverz U alakú hatásgörbéje magyarázhatja, ha ADHD fennállása esetén alacsonyabb kortikális dopamin és/vagy noradrenalin alapszinteket feltételezünk. A noradrenerg rendszer alfa-2A receptorokon keresztül erősíti a hasonló jellegű információkat szállító jeleket a kéregben, azonban nagy mennyiségű noradrenalin egyéb adrenerg (alfa-1 és béta) receptorok aktiválásával rontja a munkamemóriát. A dopamin rendszer pedig a zaj csökkentésében játszik szerepet ezen az agyterületen: a D1 receptorok stimulálásával kiszűrődnek a hasznos információval versengő jelek, ami egy ideig növeli a feladatra való koncentrációt, azonban a D1 receptor túlzott mértékű aktiválódása a feladat elvégzéséhez fontos jelek elvesztéséhez vezet, rontva a teljesítményt.



4. ábra: A katekolaminszintek és a kognitív funkciók feltételezett összefüggése a kétféle NET haplotípussal rendelkező személyeknél a beteg és kontroll csoportban. A prefrontális kéreg (prefrontal cortex, PFC) optimális katekolamin tartományát a két szaggatott vonal közötti terület jelzi, ugyanis unalmas szituációban vagy álmos állapotban túl kevés, stresszhelyzetben túl sok neurotranszmitter funkcióromláshoz vezet.

A NET gén enhancer és promoter polimorfizmusainak funkcionalitására egyelőre kevés adat áll rendelkezésünkre. A -3081 T-allél csökkent transzkripció hatékonyságot mutatott *in vitro* riporter gén rendszerben (Kim és mtsai 2006), ez alapján feltételeztük a NET -3081 T-allélt és -182 C-allélt tartalmazó haplotípusnál (T~C~T) az alacsonyabb NET expressziót és magasabb kortikális katekolamin szintet, ami javítja a kognitív teljesítményt a betegek körében (piros nyíl a 4. ábrán), ugyanakkor egészséges gyermekek esetében az optimális szint fölé nő a katekolamin szint (kék nyíl a 4. ábrán), így a figyelmi és végrehajtó funkciók romlanak.

Más munkacsoportok szülői kérdőíven alapuló genetikai asszociáció vizsgálatai nem mutattak szignifikáns összefüggést a NET polimorfizmusai és a figyelemzavar tekintetében sem ADHD-s betegcsoportban, sem átlagpopulációs mintán, így további elemzések szükségesek független beteg és kontroll mintákon, hogy a NET polimorfizmusainak a figyelemzavar kialakulásában betöltött szerepét megerősíthessük. Egyelőre limitált számú vizsgálat áll rendelkezésre az ADHD-s betegek kortikális régiójára specifikus noradrenalin transzporter szintek mérését illetően, és ezek elemszáma is alacsony. Ezért a funkcionális vizsgálatok terén is új, megbízhatóbb eredmények szükségesek a fent vázolt modell alátámasztására.

A noradrenalin transzporter gén polimorfizmusainak elemzése egy prospektív metilfenidát hatékonysági vizsgálatban

Farmakogenetikai vizsgálatunk 122 metilfenidáttal kezelt és ADHD-val diagnosztizált gyermek bevonásával történtek. A gyógyszerre adott válasz jellemzésére a tünetsúlyossági kérdőívek skála értékein való csökkenést használtuk fel: 90 gyermek (73,8%) reagált jól a gyógyszerre, legalább 25%-os tünetcsökkenést mutatva a metilfenidát kezelés első 2 hónapja után, míg 32 (26,2%) nem reagált (az ADHD-RS összpontszámuk kevesebb, mint 10%-kal csökkent). Kategorikus elemzéseinkben a χ^2 tesztet elvégezve, nem találtunk szignifikáns különbséget a NET SNP-k genotípus eloszlásánál a gyógyszerre reagáló és nem reagáló csoportok között, csupán tendencia szintű különbséget láttunk a -3081 A/T (rs28386840) és a 9. exon A/G (rs5569) SNP vonatkozásában ($p = 0,082$, illetve $p = 0,079$).

A szakirodalmi adatokkal együttesen végzett **metaanalízisünk a -3081 A/T SNP esetében alátámasztotta ezt az asszociációt** (OR: 2,70, CI: 1,27–5,72). Eredményeink publikálása közben megjelent egy másik metaanalízis is az ADHD farmakogenetikájával kapcsolatban, mely hasonló esélyhányados értékeket közölt (OR: 2,93, CI: 1,76–4,90, *Myer és mtsai 2018*).

Dimenzionális elemzéseink során is csak a -3081 A/T (rs28386840) SNP-vel kaptunk nominálisan szignifikáns asszociációt: a -3081 T-allélt hordozók nagyobb mértékű tünet csökkenést mutattak a hiperaktivitás-impulzivitás skálán ($F(1,120) = 4,26$; $p = 0,041$). Azonban 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 asszociációt mutatott a figyelemhiányos tünetsúlyossági értékekkel ($F(1,120) = 2,84$; $p = 0,094$ a kezelésben résztvevő 122 gyermek esetében). A 9. exon A/G (rs5569) SNP nem mutatott összefüggést egyik tünetsúlyossági értékkel sem.

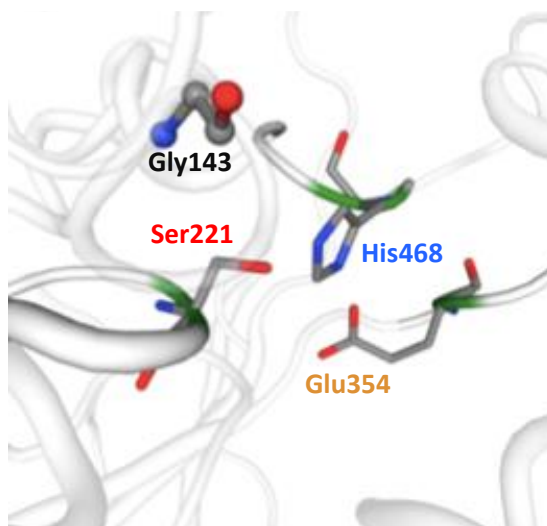
A karboxilészteráz 1 gén funkcionális polimorfizmusának elemzése a metilfenidát hatékonysági vizsgálatban

A CES1 gén Gly143Glu aminosavcserét okozó rs71647871 (G>A) polimorfizmusának genetikai vizsgálata során nem találtunk Glu/Glu homozigóta mintát sem a 173 ADHD-val diagnosztizált beteg, sem a kontroll személyek mintái között, ezért a heterozigótákat hasonlítottuk össze a vad-típusú homozigótákkal. Az eset-kontroll vizsgálatunkban nem

láttunk eltérést a genotípusok eloszlásában ($p = 0,42$): a Gly/Glu heterozigóták aránya 4,1% volt a kontroll csoportban (268-ból 11), míg az ADHD csoportban ez az arány 5,8%-ot tett ki (173-ból 10). A metilfenidátra jól, illetve nem reagálók között sem láttunk különbségeket: körükben 5,6% ill. 6,3% volt a Gly/Glu heterozigóta genotípus frekvenciája ($p = 0,59$).

Dimenzionális elemzésünk során nem találtunk összefüggést a metilfenidát hatását mérő tünetsúlyossági skála értékek és a betegek CES1 genotípusai között. Azonban összevetve 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 ($t(1,88) = 2,33$, $p = 0,022$).

Asszociáció vizsgálataink eredményei a továbbiakban mindenképpen megerősítésre szorulnak nagyobb, független betegmintákon, tekintettel arra, hogy ez a CES1 143 Glu variáns ritka, a 1000 genome projekt adatai alapján kaukázusi populációkban 1-3% körüli allél frekvenciát mutat (Ensembl adatbázis, <https://useast.ensembl.org>). A CES1 enzim szerkezetét és szekvenciáját vizsgáló tanulmányok alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált 143-as valamint a szomszédos 141-es és 142-es pozícióban lévő glicin aminosavak által kialakított HGGG motívum emlősökben rendkívül konzervált, mert az általuk alkotott oxianion lyuk elengedhetetlen a karboxilészteráz enzimek aktivitásához.



5. ábra: A CES1 enzim szerkezeti képe: a Gly143 és a katalitikus triádot alkotó aminosavak (Ser221, Glu354 és His468) színesen kiemelték a fehérje láncban (a SWISS-MODEL adatbázis <https://swissmodel.expasy.org/templates/5a7h> szerkezeti adatot használva).

5. Következtetések

Kutatási tevékenységem során a noradrenalin transzporter gén (NET, SLC6A2) polimorfizmusai és a gyermekkori ADHD, valamint a metilfenidát terápiára adott válasz tekintetében végeztünk asszociáció vizsgálatokat. Emellett a metilfenidát metabolizmusában fontos enzim, a karboxilészteráz 1 (CES1) gén funkcionális polimorfizmusának szerepét vizsgáltuk a farmakoterápiában részesülő ADHD-s betegek körében. Eset-kontroll típusú eredményeinket metaanalízisben vetettük össze az irodalomban publikált eredményekkel. 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. **Összefoglalva, genetikai asszociáció eredményeink** az alábbiakra mutattak rá:

1. A **noradrenalin transzporter gén** 1. intronjának C/T (rs3785143), illetve a vele kapcsoltságban lévő, enhancer ill. promoter régióban található -3081 A/T (rs28386840) és -182 C/T (rs2242446) egy pontos nukleotid **polimorfizmusok szerepére a figyelemzavar tekintetében**. Fontos megemlíteni, hogy egy átlagpopulációból származó gyermek mintán ellentétes asszociációt találtunk a NET gén 5' végi polimorfizmusai és a figyelemzavar között (a gyermekpszichiátriai betegsoporthoz képest). A katekolaminok prefrontális kéregben megfigyelt dóziszfüggő hatása magyarázhatja eredményeinket, ennek igazolásához azonban további asszociációs és funkcionális vizsgálatok szükségesek.
2. Az ADHD terápiájában alkalmazott **metilfenidát** válasszal összefüggésben végzett **farmakogenetikai vizsgálataink a NET enhancer régiójának -3081 A/T SNP jelentőségét** mutatták ki, melyet az eddigi nemzetközi publikációkkal végzett metaanalízisünk is alátámasztott.
3. A **karboxilészteráz 1 gén Gly143Glu aminosavcserét okozó** rs71647871 polimorfizmusának genetikai vizsgálata során eredményeink azt mutatták, hogy a CES1 143 Glu allélt hordozók esetében a **terápiás hatás eléréséhez alacsonyabb metilfenidát dózissra** volt szükség. Mivel ezidáig csak a 143 Glu variáns tekintetében számoltak be független tanulmányok konzekvensen enzimaktivitás csökkenésről, felmerül, hogy az általunk vizsgált funkcionális CES1 variáns potenciálisan bekerülhet egy egyénre szabott gyógyszerelést segítő genetikai vizsgálati panelbe.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Birkas E, Bognar 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, Bognar 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 hatóanyagtartalmú kapszulázott készítmény formulálása átkristályosított hatóanyag alkalmazásával*, ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA 74(1): 45-50. (2004)