

A dopamin D4-es receptor gén promoter polimorfizmusainak hatása a génexpresszióra in vitro rendszerekben, illetve ezek szerepe a drogfüggőség kialakulásában

A kutatási projekt három, módszertanilag jól elkülönülő, ám témájában erősen összefüggő részből állt össze. A kutatás első szakaszában folyó molekuláris biológiai vizsgálat során a drogfüggőség kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó dopamin D4-es receptor (DRD4) gén promoterének semleges és funkcionális polimorfizmusait igyekeztünk elkülöníteni génexpressziós kísérletekkel. E célból olyan riporter gén-konstruktumokat hozunk létre, melyek a DRD4 gén promoter szakaszának különböző szekvenciális változatait tartalmazzák, majd megmértük ezeknek a szekvenciáknak a promoter aktivitását idegi eredetű és kontroll sejteken. Azok a konstruktumok, melyek eltérő promoter aktivitással rendelkeznek, meghatározzák azokat a polimorf változatokat, melyek feltehetően funkcionális jelentőségűek az opiátfüggőség patogenezisében.

A projekt második részében, a pszichológiai vizsgálat során a budapesti Nyíró Gyula kórházban kezelt, és a metadon programban résztvevő opiátfüggők részletes pszichológiai jellemzésére került sor, különös tekintettel a metadonkezelésre adott terápiás válaszukra.

A harmadik, genetikai asszociáció-vizsgálatban a DRD4, a szerotonin transzporter (SERT), illetve néhány további, a heroinfüggés kialakulásában, valamint a metadonválszban esetleg szerepet játszó gén polimorfizmusait tanulmányoztuk. A 171 betegtől DNS mintát vettünk, és ezek izolálása és feldolgozása után statisztikai asszociációelemzést végeztünk a metadonválsz, a genetikai markerek és a felvett pszichológiai mérőszámok között. A munka megkezdése előtt megszereztük a kutatáshoz az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (ETT TUKEB) etikai engedélyét.

1. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

A DRD4 GÉN PROMOTER RÉGIÓJÁNAK FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE RIPORTER GÉNKONSTRUKTUMOKKAL

A DRD4 gén 5' régióját (hozzávetőlegesen 2 kb-nyi szakaszát) vizsgáltuk. Az ismert allélszerkezetű promoter régiók 6 különböző hosszúságú szakaszát (általunk önkényesen meghatározott A, B, C, D, E és F konstruktum) ismert haplotípusú személyek DNS-éből allélspecifikus amplifikációval felsokszorosítottuk, és a különböző variánsokat luciferáz riporter gént tartalmazó vektorba (pGL3) klónoztuk. Az így kapott konstrukciókat neuroblasztóma és asztrocitóma sejtekbe (SK-N- FI, Y-79, IMR-32), illetve nem neurális eredetű HeLa sejtekbe transzfektáltuk a promoteraktivitások meghatározásához. A klónozott haplotípusok ellenőrzését minden esetben szekvenálással végeztük.

A tranziens transzfekció Ca-foszfát módszerrel és lipofectinnel történt. A módszer optimalizálása neuroblasztóma sejtekre első lépésben GFP (green fluorescein protein) riporter génnel végeztük el. A továbbiakban a transzfekció hatékonyságát β -gal riporter konstrukció kotranszfektálásával mértük (belső kontroll). A transzfekciót és az összegyűjtött sejtek feltárását követően a riporter aktivitás mérése Promega luciferase assay system felhasználásával történt. Ugyanazon sejt kivonatok másik aliquotjából meghatározzuk a β -gal riporter gén aktivitást ONPG szubsztráttal. A luciferáz riporter rendszer aktivitását a β -gal riporter konstrukció aktivitására vonatkoztatjuk.

A különböző hosszúságú promoter verziók (A-F-ig) transzkripciós aktivitását összehasonlítva célunk a minimál promoter és a lehetséges aktiváló (enhancer) vagy gátló (silencer) cisz elemek meghatározása volt. Ennek során 2005-ben sikerült azonosítanunk a minimál promotert és egy lehetséges negatív regulációs elemet a promoter –1572 és –800 nukleotidok közötti régiójában. Az irodalomból ismert szövet-specifikus expressziót azonban nem tudtuk alátámasztani. Mind az idegi, mind a HeLa sejtvonalakban hasonló transzkripciós mintázatot mutatott a hattagú deléciós sorozat. A promoter karakterizálása során készített vektorokat felhasználtuk az ezen régióban található polimorfizmusok funkcionális jellemzésére is. Bizonyítottuk a 120 bp duplikáció gátló szerepét. A –521 C/T polimorfizmus esetében nem sikerült jelentős különbséget kimutatni a két allél között, ez részben cáfolja az irodalomban eddig megjelent eredményeket.

Kísérleteinkben mértük a különböző allél-változatok hatását egyenként és haplotípusban is. Vizsgáltuk a –616 C/G, –615 A/G és –521 C/T SNP, a 27 bp deléció és a 120 bp duplikáció génexpresszióra gyakorolt hatását. Egyedül a hosszúság-polimorfizmus volt dózis-függő módon hatással a DRD4 transzkripciójára. Minél többször fordult elő a 120 bp-nyi szakasz a promoterben, annál kisebb volt a mért DRD4 transzkripció (1-szeres > 2-szeres > 4-szeres ismétlődés). Megvizsgáltuk ezen polimorfizmusok együttes hatását is. A 120 bp duplikáció rövidebb változata és a –521 C/T SNP T allélja együttesen kisebb aktivitással jellemezhető neuroblasztóma és retinoblasztóma sejtvonalakban is, bár ez a hatás elsősorban a 120 bp duplikáció jelenlétének köszönhető. Vizsgáltuk ezen kívül a –616 C/G és –615 A/G SNP-k haplotípusait is. A G-G kombináció mind SK-N-FI, mind Y79 sejtekben szignifikánsan kisebb aktivitással bírt a többi haplotípushoz képest. A –616 C/G, –615 A/G és –521 C/T polimorfizmusok haplotípus vizsgálatából kitűnik, hogy a “GGC” haplotípus kisebb aktivitással bír az egyéb verziókhöz képest.

A régióban *in silico* kereséssel transzkripciós faktorok lehetséges kötőhelyeit azonosítottuk be a DRD4 promoterében. Kotranszfekciós kísérletekben megkezdtük néhány faktor (HNF4 α , a Hif1 α és a RAR/RXR) DRD4 szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatát. Tervezzük még ezen transzkripciós faktor kötőhelyek polimorf jellegének elemzését is. Az *in vitro* eredmények függvényében *in vivo* kísérleteket tervezünk. Elsősorban valós DNS-fehérje kölcsönhatások kimutatását tervezük kromatin immunprecipitációs módszerrel, illetve a közeljövőben további kotranszfekciós és elektroforetikus mobilitás eltolódás (EMSA) vizsgálatokat tervezünk ezen lehetséges kötőhelyek jelentőségének meghatározására.

A fenti eredményeket nemzetközi és hazai konferenciákon poszterek formájában ismertettük, valamint egy külföldi publikáció született belőle 2006-ban.

2. A KLINIKAI POPULÁCIÓ FENOTÍPUSOS JELLEMZÉSE

A vizsgálati személyek bevonása a jelen OTKA pályázatba két lépcsőben folyt:

A vizsgálat első szakasza prospektív adatfelvétellel zajlott 2001 márciusa és 2004 áprilisa között az NKFP 5 118/2001 kutatás keretében. Ezen szakasz során valamennyi, a 2001 márciusa és 2003 márciusa közötti időszakban, a Nyírő Gyula Kórház Drogambulanciáján 3 hónapnál hosszabb időre tervezett metadon kezelésbe kerülő opiátfüggő beteget bevontuk a vizsgálatba (200 fő). A vizsgálat célja a fenntartó metadon kezelés hatékonyságának monitorozása, a kezelés során a kliensek viselkedésében, hangulati dimenziókban, illetve személyiségpszichológiai jellemzőiben beálló változások mérése volt. Valamennyi vizsgálati személy esetében részletes adatfelvétel történt a kezelésbe kerüléskor. Ezt követően három hónapig havonta, majd a továbbiakban minden harmadik hónapban történt újabb részletes adatfelvétel. Az adatfelvétel 2004 áprilisában zárult, ily módon valamennyi kliens esetében biztosított volt a minimálisan egy éves utánkövetés. Ezt követően 2005 augusztusában, majd 2007 októberében gyűjtöttünk kontroll adatot a vizsgálati személyekről. Ezen időpontokban adatfelvétel nem történt, hanem csupán a kliens aktuális helyzetét ellenőriztük.

A második fázis során (immár a jelen OTKA projekt keretei között) egyrészt az adatfelvétel genetikai paraméterrel történő kiegészítése történt meg, másrészt ebben a fázisban további 81 fő, fenntartó metadon terápiában részesülő opiátfüggő kliens bevonására került sor. Az eredeti 200 fős mintából 90 fő volt az, aki elérhető volt és vállalta is az OTKA projektben a genetikai mintaadást. Rajtuk kívül azonban sor került további 81 fő esetében is genetikai mintavételre. Közülük 60 fő a Nyírő Gyula Kórház Drogambulanciáján 2004 szeptembere és 2005 augusztusa között kezelésbe kerülő kliensek közül került ki; a korábbi mintavétellel megegyező módon. További 21 fő négy vidéki Drogambulanciáról (Pécs, Veszprém, Gyula, Miskolc) került a vizsgálatba. Veszprémben és Miskolcon (10 fő) szintén a 2004 szeptembere és 2005 augusztusa között 3 hónapnál hosszabban tervezett fenntartó metadon kezelésbe jelentkezők kerültek a vizsgálatba, míg Pécsen és Gyulán valamennyi, a fenti vizsgálati időszakban aktuálisan kezelésben lévő személy. A genetikai mintavétel mellett, esetükben is sor került a drogkarrier, illetve a kezelési karrier feltárására, valamint a szociodemográfiai adatok rögzítésére, egyéb paramétereket azonban esetükben nem vizsgáltunk.

Eszközök

A vizsgálat során az alábbi kérdőíves és interjú módszereket alkalmaztuk:

- a szociodemográfiai adatokat, a drogkarriert és a kezelési történetet rögzítő kérdőív
- a fontosabb családi jellemzőket rögzítő kérdőív
- *Metadon Kezelési Interjú*, amely a kliens fontosabb életterületeinek felmérését foglalta magába
- STAI szorongás kérdőív (Spielberger, 1972)
- CES-D depresszió kérdőív (Radloff, 1977)
- étellel való elégedettség (SWLS - Diener és mtsai, 1985; LSS - Campbell és mtsai, 1976)
- CPI (Oláh, 1984)
- pszichológiai immunrendszer kérdőív (PISI) (Oláh, 1996 és 2000)
- Rokeach-féle értékvizsgálat (Rokeach, 1973; Szakács, 1974; Szakács és Szakács, 1988)

A vizsgálat felépítése

A vizsgálati protokoll szerint valamennyi klienssel, az ambulanciára történő felvételét követően, de lehetőség szerint, a gyógyszeres kezelést megelőzően igyekeztünk az első adatfelvételt elvégezni. Ezt követően előbb havonta, majd kéthavonta, később ennél is ritkábban került sor adatfelvételre. A vizsgálat pontos menetét az 1. táblázat mutatja.

adat-felvétel		Metadon Kezelési Interjú	STAI	CES-D	SWLS, LSS	CPI	PISI	Rokeach
1. (T ₀)	T ₀	X	X	X	X	X	X	X
2. (T ₁)	+ 1 hónap	X	X	X	X			
3. (T ₂)	+ 1 hónap	X	X	X	X			
4. (T ₃)	+ 1 hónap	X	X	X	X			
5. (T ₄)	+ 2 hónap	X	X	X	X			
6. (T ₅)	+ 2 hónap	X	X	X	X			
7. (T ₆)	+ 2 hónap	X	X	X	X			
8. (T ₇)	+ 3 hónap	X	X	X	X	X	X	X
9. (T ₈)	+ 4 hónap	X	X	X	X			
10. (T ₉)	+ 4 hónap	X	X	X	X			
11. (T ₁₀)	+ 8 hónap	X	X	X	X			
12. (T ₁₁)	+ 8 hónap	X	X	X	X			
13. (T ₁₂)	+ 8 hónap	X	X	X	X			

1. Táblázat A vizsgálati protokoll

Eredmények

Az első vizsgálati periódusban 200 fővel készült el legalább egy adatfelvétel. A további adatfelvételek alakulását a 2. táblázat mutatja be.

Adatfelvételek	Időpont	Fő	Hány % az első adatfelvétel tükrében	A következő adatfelvételig kiesett
T ₀	kezelésbe kerüléskor	200	100%	36 fő (18,0%)
T ₁	+1 hónap	164	82,0%	33 fő (21,1%)
T ₂	+2 hónap	131	65,5%	11 fő (8,4%)
T ₃	+3 hónap	120	60,0%	26 fő (21,7%)
T ₄	+6 hónap	94	47,0%	9 fő (9,6%)
T ₅	+9 hónap	85	42,5%	5 fő (5,9%)
T ₆	+12 hónap	90	40,0%	5 fő (6,3%)

2. Táblázat Az adatfelvételek számának alakulása

A kezelés sikerességét a terápiában maradással definiáltuk, s ez alapján 4 csoportot alakítottunk ki. Az első ütemben összesen 36 fő (1) legfeljebb 1 hónapig maradt kezelésben, (2) 44 személy 1-3 hónapig, (3) 26 személy 3-6 hónapig, míg (4) 94 fő legalább 12 hónapig).

Szociodemográfiai jellemzők

A vizsgálati személyek 71%-a férfi. A személyek átlagéletkora a vizsgálatba kerüléskor 27,2 év (szórás 5,2). Döntő többségük (87,2%) Budapesten él, s a fennmaradó rész többsége is városban. A falun lakók aránya 3,1%.

Valamivel kevesebb, mint minden ötödik személy (18,1%) ép családban él, míg 15,6% azok aránya, akik csak az egyik szülővel élnek együtt. A legtöbben (22,4%) partnerükkel élnek, de viszonylag magas a saját családot alapítók aránya is (9,5%). Ugyanennyien élnek egyedül (9,5%).

Valamivel több, mint minden harmadik személy (38%) csak általános iskolai végzettséggel (vagy azzal sem) rendelkezik, míg 58,5% a középfokú, s 3,5% a felsőfokú végzettséggel rendelkezők aránya.

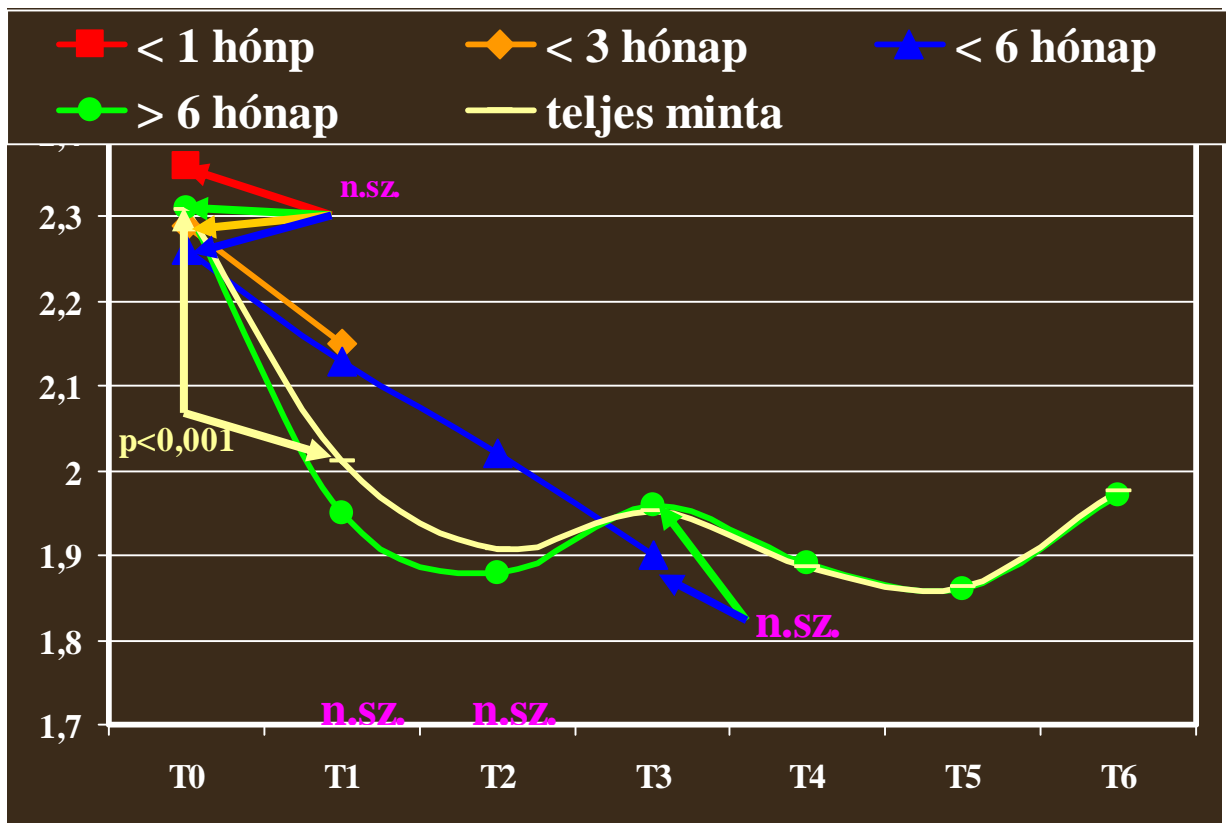
Droghasználat, drogharrier

Az átlagos opiát-használati múlt 7,1 év (sd=3,8 év) (minimum 2 év maximum 22 év). Droghasználat miatti ambuláns kezelések száma: 1,8 (sd=1,45) (0-7); osztályos kezelések száma: 2,1 (sd=1,9) (0-9); rehabilitációs kezelések: 0,5 (sd=0,97) (0-5)

A vizsgált pszichológiai dimenziók alakulása

Depresszió

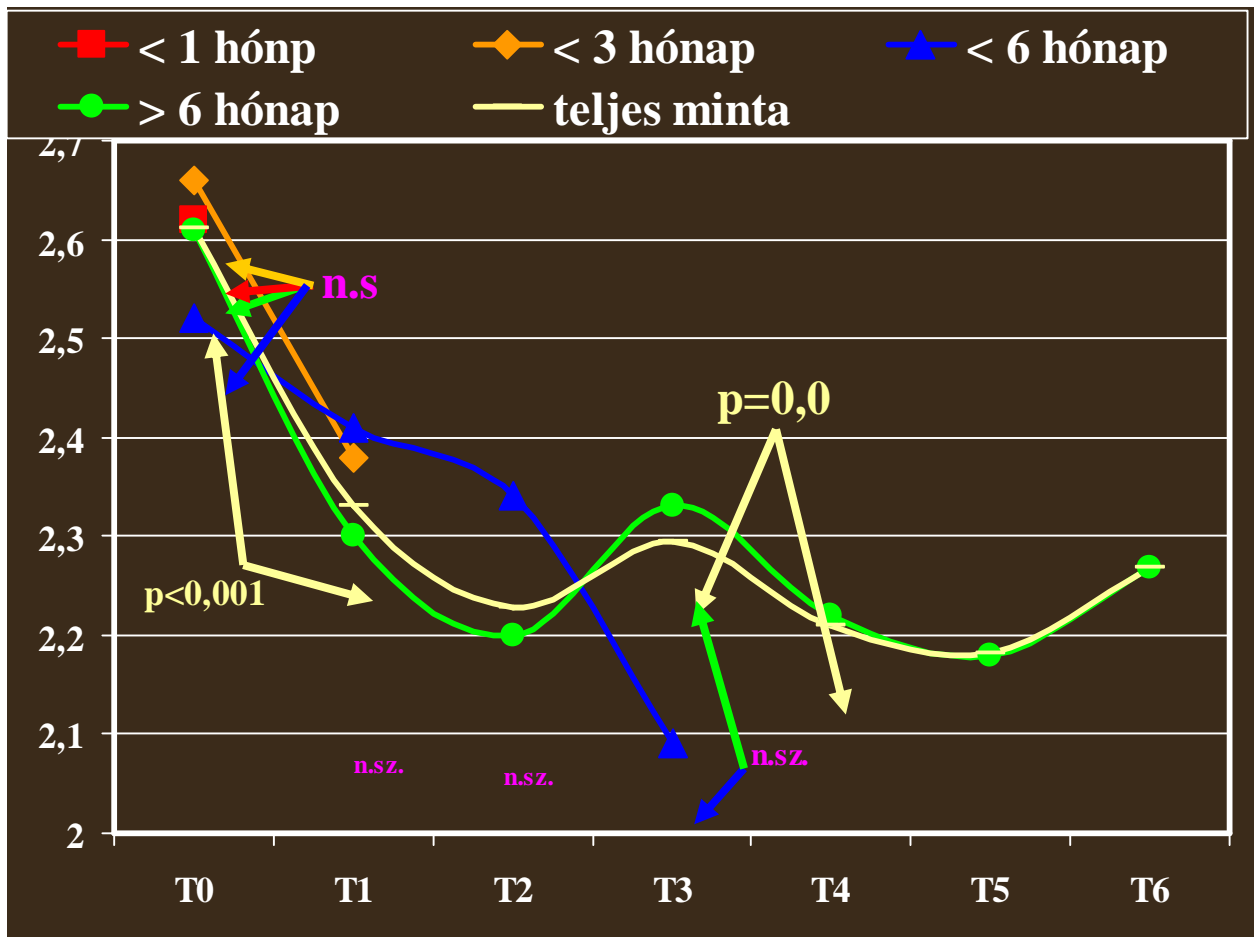
Mint az az 1. ábrán is látható, a kezelésbe kerülés utáni hónapban igen jelentős javulás volt megfigyelhető a kliensek hangulatában. A következő hónapban ez a tendencia lelassult, illetve stagnált. Fontos eredmény, hogy a kezelésben maradók, illetve a kezelésből kiesők között nem mutatkozott szignifikáns különbség az egyes adatfelvételi időpontok mentén, azaz, mindaddig, amíg a személyek kezelésben maradtak, a későbbi kimeneteltől függetlenül egyformán alakult a depresszió mértéke.



1. ábra A depresszió alakulása

Szorongás

Gyakorlatilag a depresszióval azonos tendencia mutatkozott a szorongás esetében is. Az első két hónap javuló tendenciája a későbbiek során lecsökkent, stagnált, a két csoport között azonban semmilyen különbség nem mutatkozott

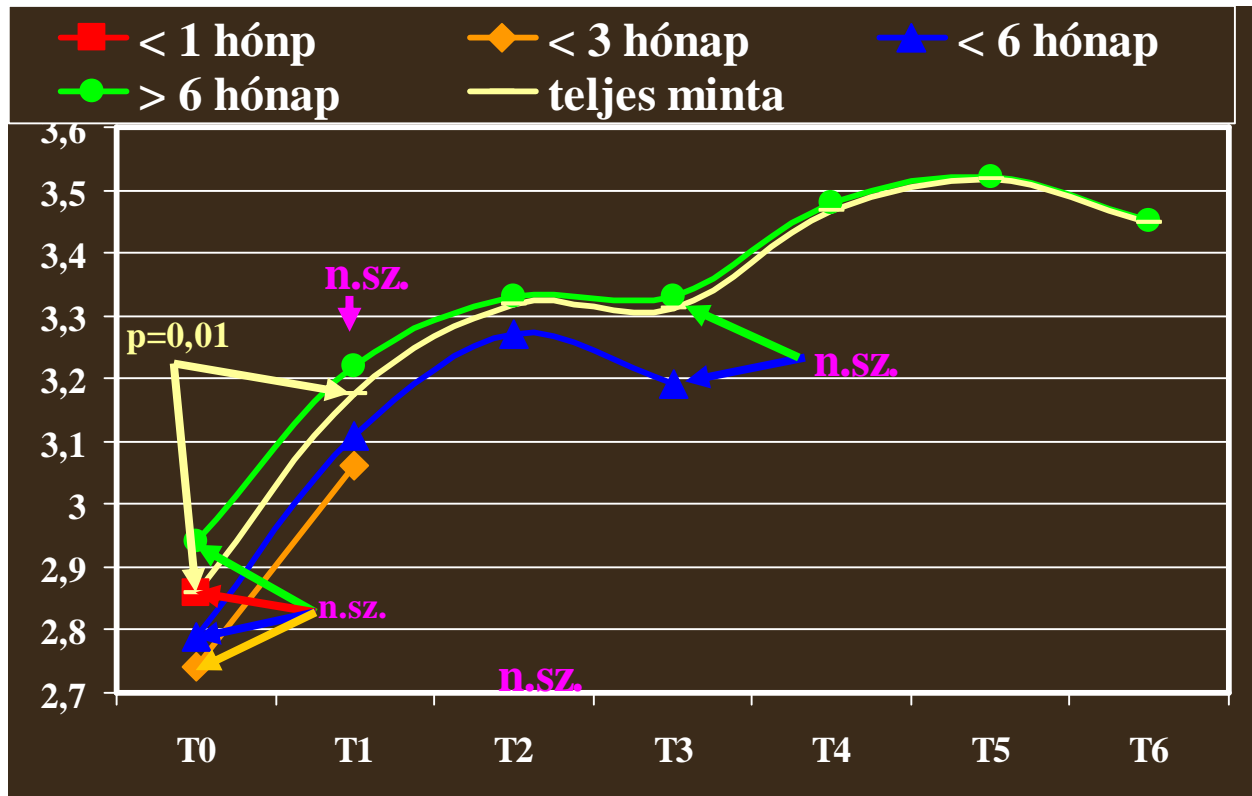


2. ábra A szorongás alakulása

Élettel való elégedettség

Az előző két dimenzióhoz hasonló tendencia mutatkozott az élettel való elégedettség esetében is; mindkét mérőeszköz (SWLS) esetében.

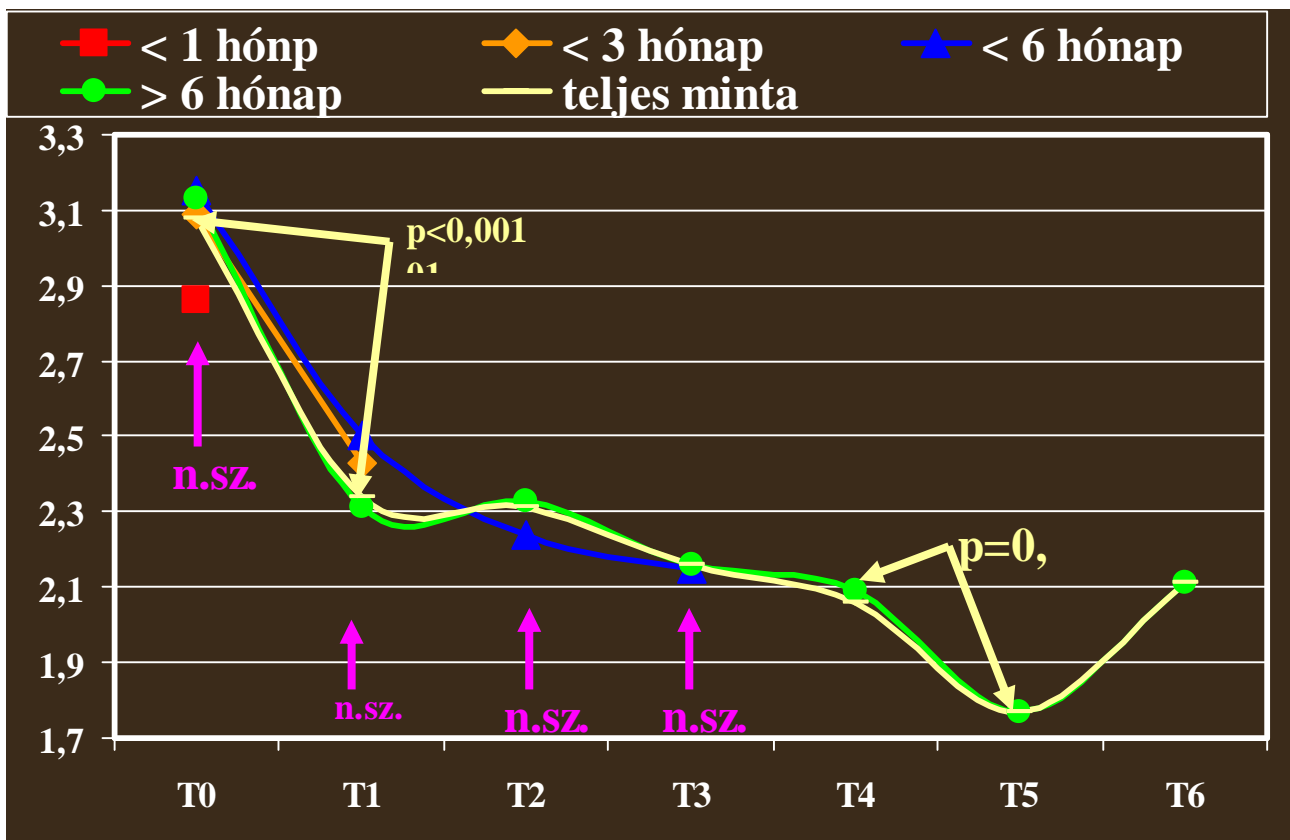
Kezdeti javulást követően a második hónapra kialakult érték stagnált, esetleg kisebb ingadozásokat mutatott, illetve itt is megjelent a két csoport adatai közötti eltérés hiánya.



3. ábra Az élettel való elégedettség (SWLS skála) alakulása

A Metadon Kezelési Interjú adatainak elemzése

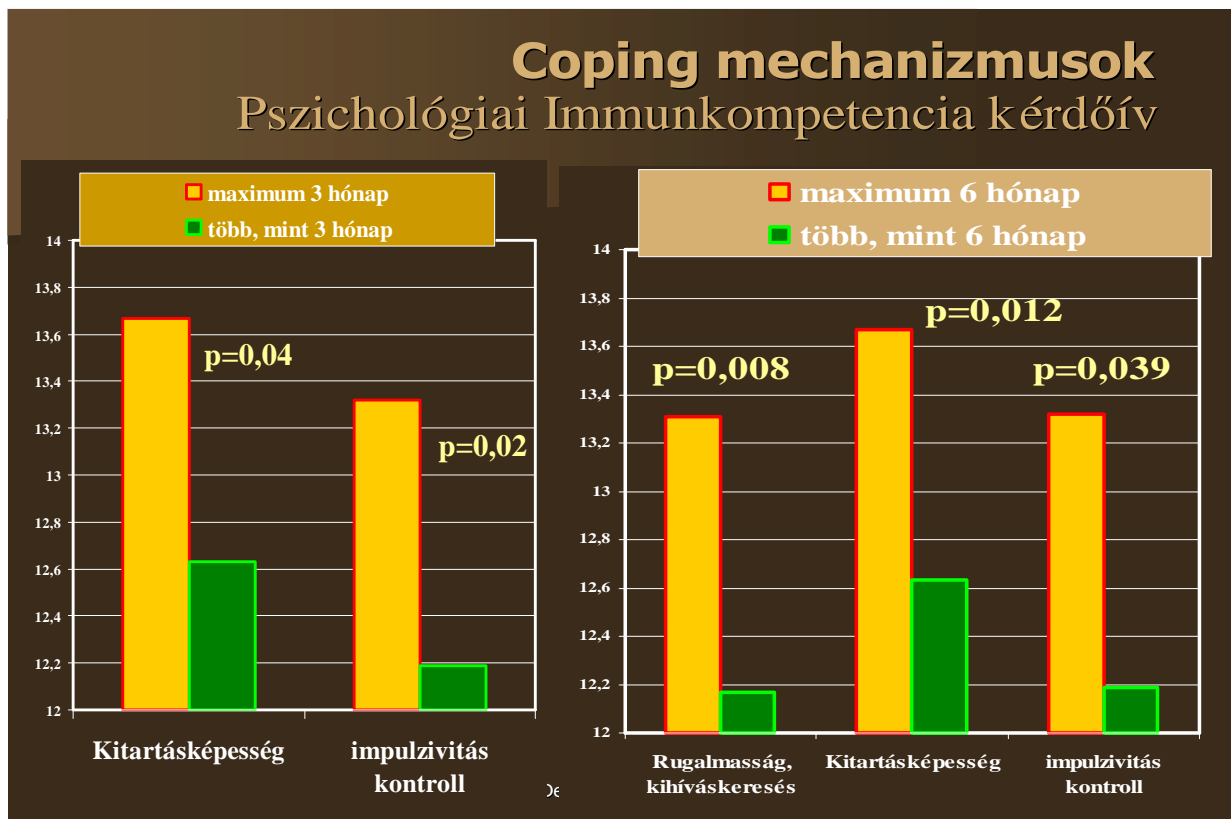
A Metadon Kezelési Interjúban mutatkozó eredmények összhangban vannak a fenti eredményekkel. A vizsgált dimenziókban itt is megmutatkozott – mind a szubjektív, mind pedig az objektív dimenziókban – a kezdeti javulás, amely a kezelésben maradás időszakában fent is maradt. Ugyanakkor, hasonlóan a fenti eredményekhez itt sem jelentkezett olyan különbség a kezelés során mutatkozó adatokban, amely alapján előre lehetett volna jelezni a kezelés sikerességét (kezelésben maradást), illetve sikertelenségét. A 4. ábra a testi megvonási tünetek alakulását mutatja.



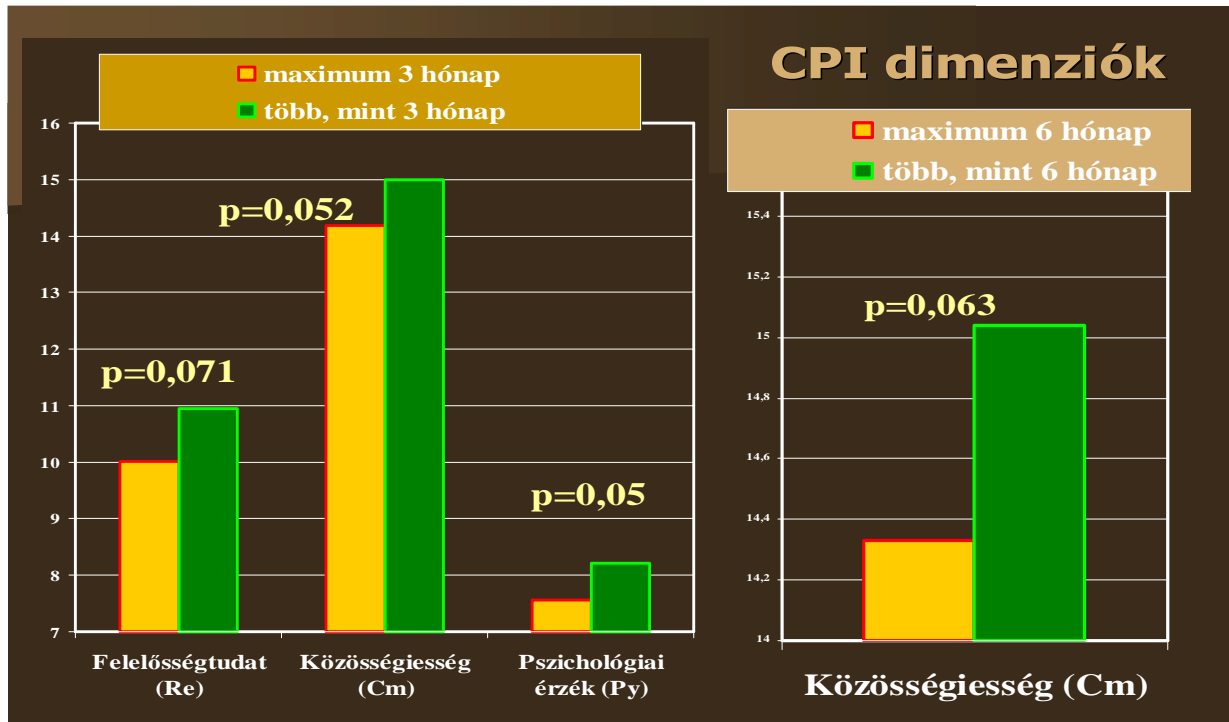
4. ábra A testi megvonási tünetek alakulása

A bekerülési adatok és a sikeresség kérdése

Fontos kérdés, hogy mely tényezők befolyásolhatják a kezelésben maradáást. A pszichológiai dimenziók közül a Pszichológiai Immunkompetencia Kérdőív Kitartásképesség, Impulzivitás kontroll és Rugalmasság skálája mutatott szignifikáns különbséget e tekintetben.



A Kalifornia Pszichológiai Interjú esetében is három dimenzió, a felelősségtudat, a közösségiesség és a pszichológiai érzék differenciált a hosszabban kezelésben maradó, illetve a kiesők között.



Összefoglalva, a vizsgálat első üteme során 200 fő, 2001 márciusa és 2003 márciusa között fenntartó metadon kezelésbe került kliens adatait elemeztük.

Az elkészült összesen 965 interjú, illetve pszichológiai tesztek elemzése azt mutatja, hogy a fenntartó metadon kezelés hatékony a pszichológiai distressz csökkentésében, illetve várt viselkedési változások (illegális droghasználat, kockázati magatartások stb.) elérésében. Egyértelmű tapasztalat, hogy a kliensek állapotában a javulás már a kezelés első hónapjában megmutatkozik, ezt követően pedig az állapot stabilizálódása jellemző.

Fontos tapasztalat, hogy a kezelés eredményességét legjelentősebben befolyásoló eredménynek a „kezelésben lét” bizonyult, azaz a kezelést később elhagyók, illetve bent maradók között a kezelésben való részvétel ideje alatt nem mutatkozott különbség.

A kezelés valószínűbb elhagyásának hátterében elsősorban a kihívások intenzívebb keresését, az énhatékonyság magasabb szintű megélését feltételezhetjük.

Módszertani tapasztalat, hogy az általunk kialakított Metadon Kezelési Interjú jó mérőeszköznek bizonyult a fenntartó metadon kezelés nyomon követésében. Általánosan megmutatkozott, hogy a kezelőszemélyzet valamivel kedvezőbben látja az egyes dimenziók mentén a kliensek állapotát, mint maguk a kliensek, ugyanakkor a tendenciák egyértelműen egy irányba mutatnak. Jövőbeli fejlesztési lehetőségként az interjú lerövidítése merülhet fel, illetőleg jelen tapasztalatok tükrében megfontolandó a ritkább adatfelvétel alkalmazása is.

A második fázis során (azaz az OTKA projekt keretei között) felkínáltuk a vizsgálatban való részvételi lehetőséget a metadon programba újonnan bekerülőknél is. Náluk a szociodemográfiai, családi, valamint a droghasználatra és a kezelésre vonatkozó adatok mellett az alábbi mérőeszközöket alkalmaztuk:

- Addikció Súlyossági Index (Addiction Severity Index, ASI)
- STAI szorongás kérdőív
- CES-D depresszió kérdőív
- CPI
- pszichológiai immunrendszer kérdőív (PISI)

A betegek utánkövetése során még két további pszichológiai kérdőív is felvételre került:

- Temperament and Character Inventory (TCI)
- Attention Deficit and Hyperactivity Disorder kérdőív felnőttkori, retrospektív verziója (ADHD-RS)

A résztvevők számának növelése érdekében 2005-ben vizsgálatainkat kiterjesztettük a soroksári, illetve pécsi rehabilitációs intézetekben metadonnal kezelt betegekre is. Ilyen módon a 2004-es 96 személyen és a 2005-ös 63 személyen túlmenően 2006-ban az új központokból további 17 főt sikerült a vizsgálatokba bevonni. Ezzel a 176 fővel egyrészt meghaladtuk a vizsgálatba összesen bevonni kívánt 150 fős létszámot, másrészt gyakorlatilag kimerítettük a Magyarországon általunk reálisan elérhető betegek körét. A vizsgálatba belépők közül néhányan később visszavonták részvételi szándékukat, az ő DNS mintájukat és felvett fenotípusos adataikat az etikai engedély előírásainak megfelelően megsemmisítettük, illetve az adatbázisainkból töröltük. Így módon a későbbi statisztikai analíziseket 171 fővel végeztük.

A vizsgálatba bevontak számát tovább növelendő 2006 decemberében megkezdtük absztinenssé vált korábbi heroinfüggők mintáinak gyűjtését is, ettől a körülbelül 50 fős mintától, melyet egy későbbi kutatás keretében kívánunk vizsgálni, azt reméljük, hogy az előzetes eredményeinket statisztikailag megerősítik.

A heroinfüggő betegekkel illetve egészséges kontrollokkal felvett ADHD-RS kérdőíves vizsgálataink kimutatták, hogy mind a figyelemhiány, mind a hiperaktivitás skálaértékei erős nemi hatást mutatnak, a férfiakra magasabb pontszámok jellemzőek mindkettő esetében. Ugyancsak sikerül megerősíteni, hogy a (kezeletlen?) gyermekkori ADHD a későbbi szerfüggőség kialakulásának rizikófaktora lehet.

Az ADHD-RS és TCI kérdőívvel kapott mérőszámokat statisztikailag összevetettük az általunk megvizsgált gének polimorfizmusával, és azt találtuk hogy számos génvariáns összefüggésbe hozható az ADHD kérdőív figyelemhiány (Attention deficit, Attent. Def.), hiperaktivitás (Hyperact.), illetve az teljes (Total) értékkel. Hasonló összefüggéseket láttunk a TCI személyiség kérdőív temperamentum és karakter dimenziói (újdonsgkeresés, novelty seeking, NS, ártalom elkerülés, harm avoidance, HA, jutalomfüggés, reward dependence, RD és kitartás, persistence, Pers.) és a különböző génvariánsok között (amelyekről részletesebben később a Molekuláris Genetikai eredmények között szólnunk) (3. és 4. Táblázat).

Dopamin a_h2dup521	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
COMT allele_comt	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Dopamin h2dup616	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Dopamin DRD4 615AG drd4 615ag	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Dopamin - D2Taq A C vs T	0,077	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Dopamin - D2Taq B A vs G	0,054	n.sz.	0,067	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Dopamin - D2Taq D C vs T	n.sz.	0,043	0,051	n.sz.	n.sz.	0,076	n.sz.

A fenti eredményeket nemzetközi és hazai konferenciákon posztterek és előadások formájában ismertettük. 2007-ben egy hazai folyóiratban jelent meg egy publikáció az ADHD-RS kérdőív eredményeivel, valamint egy külföldi összefoglaló publikáció született belőle 2008-ban, amelynek kézírata jelenleg lektorálás alatt van az Addiction Reserch and Theory folyóiratnál. Ezen kívül tervezzük még a közeljövőben a további eredmények publikálását cikkek formájában

3. MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK

A fenti, fenotípusosan jól jellemzett klinikai populációtól a megfelelő tájékoztatás és a beleegyező nyilatkozat aláírása után nem invazív módszerrel DNS mintát vettünk (fültörelő vattával a szájüreg belső felületéről gyűjtünk nyálkahártya sejteket, a mintavételt a kliens maga végezte). A DNS izolálása kisózással (Gentra Kit) történt. 2005-ben egy új mintavételi eljárást is bevezettünk szájvíz alkalmazásával, ezzel növelhető volt a kinyert DNS mennyisége.

A genetikai analízis során általában két, parallel módszert alkalmaztunk az egyponos nukleotid polimorfizmusok (single nucleotide polymorphism, SNP) meghatározására: egy PCR-RFLP technikát és egy kétirányú allél-specifikus amplifikációt (kétirányú ASA). A párhuzamos meghatározások alkalmazása növelte a genotípus azonosításának megbízhatóságát.

A fenti módszerekkel a DRD4 promotor 4 polimorfizmusának (120 bp duplikáció, -616, -615, -521 SNP), illetve a 3. exon 48bp VNTR vizsgálatára került sor, a második évben pedig megkezdtük a SERT gén polimorfizmusainak vizsgálatát. Az eredeti munkatervben vállaltakon túl 2006-ban elvégeztük a dopamin transzporter (DAT) gén egy újonnan felfedezett polimorfizmusának (intron8 VNTR) vizsgálatát, a katekol-o-metiltranszferáz (COMT) gén egy variánsának, 2007-ben pedig a DRD2 gén három különböző, az irodalmi adatok alapján a szerfüggőséggel kapcsolatba hozható TaqI polimorfizmusának meghatározását is.

Az elvégzett genotipizálások adatainak részleges statisztikai analízisét a szakirodalomban elfogadott módszerekkel végeztük el. Megtörtént a kapott eredmények egybevetése a fenotípusos adatokkal és a betegek metadonkezelésre való reagálásával. (5. és 6. Táblázat)

A táblázat oszlopai azt az időt mutatják, hogy a beteg a kezelésbevételtől hány hónapon át maradt még kezelésben. A kezelésből kiesők általában visszatérnek a heroinhoz, gyakran bűncselekményeket követnek el, ami miatt letartóztatásba, börtönbe kerülnek, vagy meghaltak. A kezelésben maradókat soroltuk a metadonra jól reagáló csoportba, és statisztikailag összehasonlítottuk a kezelésből kiesők genotípus adataival. A táblázatban a szignifikáns ($p \leq 0,05$), illetve tendenciát mutató ($p \leq 0,1$) p értékeket tüntettük fel a megfelelő génvariációk soraiban 171 beteg elemzése alapján.

5. Táblázat

A dopamin és szerotonin rendszer génpolimorfizmusainak hatása a metadonkezelés hatékonyságára (genotípus analízis)

	kezelésbevétel után meddig marad						
	Chi-Square Test						
	1 hó	2 hó	3 hó	5 hó	6 hó	11 hó	12 hó
Dopamin - DRD4 VNTR							
non_2_2	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
non_4_4	0,067	0,042	0,059	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
non_7_7	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.

Szerotonin transzporter

sert3_ge	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
sert2_ge	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.
sert2_g2	n.sz.	n.sz.	n.sz		n.sz		n.sz

Dopamin - DRD4 prom

g_521ct	n.sz	n.sz	0,016	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz
t_nt_521	n.sz.	n.sz.	0,017	0,05	0,097	n.sz.	n.sz
c_nc_521	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz

Dopamin - DRD4 prom

g_616cg	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
c_nc_616	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
g_ng_616	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz

Dopamin - DRD4 prom

g120dup_	n.sz	n.sz	0,031	0,085	0,033	n.sz.	0,03
n1_1_120	n.sz	n.sz	0,09	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,061
n2_2_120	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.

Szerotonin transzporter

stin3_ge	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,093	n.sz.	n.sz.
stin2_g1	0,093	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
stin2_g2	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,048	0,031	0,09	n.sz.

Dopamin transzporter

dat_komb	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
dat_kmb1	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.	0,08	0,069
dat_kmb2	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.

COMT

comt_3g	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
comt_2g1	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
comt_2g2	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz

Dopamin DRD4 615AG

egy_kett	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
egy_k_g	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz	n.sz
egy_k_a	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz	n.sz

Dopamin - D2Taq A

D2TaqA3g	0,096	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqAcnc	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqAtnt	0,032	0,082	n.sz	n.sz	0,076	n.sz.	n.sz.

Dopamin - D2Taq B

D2TaqB3g	0,08	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqBana	0,054	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqBgng	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	0,063	n.sz	n.sz.

Dopamin - D2Taq D

D2TaqD3g	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqDcnc	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
D2TaqDtnt	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	0,068	n.sz

6. Táblázat

A dopamin és szerotonin rendszer génpolimorfizmusainak hatása a metadonkezelés hatékonyságára (allél analízis)

	kezelésbevitel után meddig marad						
	Chi-Square Test						
	1 hó	2 hó	3 hó	5 hó	6 hó	11 hó	12 hó
Dopamin - DRD4							
DRD4 3 csop	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
non_2_2	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
non_4_4	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
non_7_7	0,028	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
Szerotonin transzporter							
a_htt1p_	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
Dopamin - DRD4 prom							
allél_521ct	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz
Dopamin - DRD4 prom							
allél_616cg	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
Dopamin - DRD4 prom							
allél_120dup	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
Szerotonin transzporter							
allél_stin	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
a_stin_2 (10 vs 12)	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,052	n.sz.	n.sz.
allél_stin10 - non10	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,048	n.sz.	n.sz.
allél_stin12 non 12	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,033	0,074	n.sz.

Dopamin transzporter

a_dat (mind: 6,7,9,10,11)

a_dat910 (9 vs 10)!!!	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz	0,048	0,038
a_dat_9 (9 - non9)	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz.	n.sz	0,069	0,056
a_dat_10(10 - non10)	n.sz	n.sz	0,077	0,098	0,077	0,025	0,018

Dopamin

a_h2dup521	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	0,036
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

COMT

allel_comt	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
------------	-------	-------	-------	------	------	------	------

Dopamin

h2dup616	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.
----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Dopamin DRD4 615AG

drd4 615ag	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz.	n.sz
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

Dopamin - D2Taq A

C vs T	0,062	n.sz	0,088	n.sz	0,048	n.sz	n.sz
--------	-------	------	-------	------	-------	------	------

Dopamin - D2Taq B

A vs G	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
--------	------	------	------	------	------	------	------

Dopamin - D2Taq D

C vs T	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz	n.sz
--------	------	------	------	------	------	------	------

Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk vizsgált gének közül a dopamin D4-es receptor (DRD4) promoterében található két különböző polimorfizmus, a -521 C/T SNP, illetve a 120 bázispáros duplikáció (mindkettő génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk korábban a transzfecciók kísérleteinkben), valamint a 3. exon 48 bázispáros ismétlődési polimorfizmusa (VNTR-e) is úgy tűnik, hogy befolyásolja a betegek metadonválaszát. Ezen kívül a szerotonin transzporter (SERT) Stin2 intronikus polimorfizmusa, a dopamin transzporter (DAT) egy variánsa, illetve a dopamin D2-es receptor (DRD2) TaqI polimorfizmusai közül több is összefügghet a gyógyszer egyénre szabott hatékonyságával. Ez utóbbi gén szerepe azért is különösen érdekes, mert korábban más munkacsoportok, illetve eset-kontroll vizsgálatban nemrég mi magunk is kimutattuk a Taq1A rizikófaktor szerepét a heroinfüggés kialakulásában, de ezek szerint nem csak abban, hanem a terápiás válaszban jelentőséggel bír. Ez az érdekes kettős hatás mindenképpen érdekessé teszi ezt a polimorfizmust további génexpressziós, illetve pszichogenetikai asszociációs analízisekre a jövőben. Ez a variáns egyébként a géntől meglehetősen távol helyezkedik el, azaz feltételezhetően marker szerepet tölt be, és valamely hozzá kapcsolódó variáns felelős a funkcionális hatásért.

A metadonkezelés hatásosságának genetikai meghatározottságáról kapott eredményeket több hazai és külföldi konferencián, illetve a tudományterület legrangosabb nemzetközi kongresszusán (World Congress of Psychiatric Genetics) ismertettük előadások és poszterek formájában. Jelenleg készül a témához kapcsolódó két külföldi folyóiratcikk kézírata, az egyik a metadonhatás genetikai összefüggéseiről, a másik az eset-kontroll eredményekről számol be.

AZ ELVÉGZETT MUNKA SZAKMAI- ELMÉLETI- GYAKORLATI HASZNA

A jelen OTKA támogatás keretében megvalósult projekt terv jelentős részben alap kutatás jellegű, és mint ilyen, alkalmazása szakirodalmi megerősítésre vár. Ezért az eredményesség legfontosabb mércéje a szakmai folyóiratokban történő publikáció, illetve az eredményeink más munkacsoportok általi megerősítése. A szakmai eredmények a következők:

1. A DRD4 promoter régiójában előforduló genetikai polimorfizmusok funkcionális jellemzését elvégeztük és meghatároztunk a génextpresszió szabályozásáért felelős vátozatokat. Ezek az eredmények hozzájárulhatnak a szövetspecifikus génextpresszió mechanizmusainak megértéséhez, különös tekintettel az idegrendszerre.
2. A jelen témapályázatban a korábbi irodalmi adatok, valamint saját funkcionális vizsgálatunk eredményei alapján kiválasztott genetikai polimorfizmusokat felhasználtuk pszichogenetikai asszociáció vizsgálatunkban az opiátfüggőség genetikai rizikófaktorainak kutatásaiban. Ha bizonyítható a vizsgált polimorfizmusok tényleges szerepe az addikció kialakulásában, akkor ez értékes lépés az addikció mechanizmusának megértéséhez.
3. A vizsgálatok farmakogenetikai aspektusát adja a genetikai rizikófaktorok és a metadon program hatékonyságának összehasonlító vizsgálata. Sikerült összefüggést kimutatni a dopamin és a szerotonin rendszer genetikai polimorfizmusai és a metadonkezelés hatékonysága között és ez az eredmény fontos szerepet kaphat a metadon alkalmazásának farmakogenetikai vonatkozásában. Amennyiben az általunk talált eredmények mások által is megerősítést nyernek, úgy a jövőben ezeket a genetikai markereket az egyéni terápiás terv kialakításánál a klinikus figyelembe veheti. Ha sikerül elégséges genetikai és pszichológiai (személyiség) faktorról bebizonyítani, hogy azoknak rizikó, illetve éppen ellenkezőleg, védő hatása van egy bizonyos terápiás lehetőség kimenetelének szempontjából, akkor ezek figyelembevételével lehet megválasztani az alternatív kezelési módokat (pl. fenntartó metadonkezelés vs. rehabilitációs kezelés a heroinfüggők esetében). Az ilyen egyénre szabott terápiás módok kialakításában a jövőben egyre nagyobb szerephez jut majd a farmakogenetika.