

monostory\_24\_22

MTA Doktori Értekezés

**Citokróm P450 enzimekhez köthető gyógyszer-metabolizmus a gyógyszerbiztonság tükrében: az *in vitro* megközelítéstől a klinikai alkalmazásig**

Monostory Katalin

Természettudományi Kutatóközpont  
Enzimológiai Intézet

Budapest  
2022

monostory\_24\_22

# monostory\_24\_22

Ajánlás

Nagyapámnak (Felső Ferencnek), aki szeretett volna az orvosi pályán látni

és

szüleimnek (Felső Katalinnak és Monostory Adorjának), akik örültek volna, ha  
vegyésmérnökként, de legalábbis a kémiához közel folytatom az általuk megkezdett utat.

## monostory\_24\_22

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani családomnak, akik egész életemben mellett álltak, nagyszüleimnek és szüleimnek, akik elindítottak a pályán és hittek bennem. Külön szeretném megköszönni férjemnek a szeretetet, támogatást és a végtelen türelmet, amellyel elfogadta, hogy a munkaidő nem ér véget délután 4 órakor. Sokat jelentenek számomra gyermekeim és családjaik, akik pezsgést visznek az életembe.

Őszinte hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni Vereczkey Lászlónak, PhD témavezetőmnek és a Farmakobiokémiai Osztály (MTA Kémiai Kutatóközpont) volt vezetőjének, hogy bevezetett a farmakokinetika rejtelseibe, engedte, hogy szabadon dolgozzak, ugyanakkor türelemmel nyesegette „vadhajtásaimat” és sokat tett azért, hogy önálló kutató válhasson belőlem. Köszönöm Grényi Máriának a mindennapi közös munkát, a biztatást és a sok bölcsességet az élet kicsi és nagy dolgairól.

Köszönettel tartozom a MTA Kémiai Kutatóközpont egykori főigazgatójának, Pálincás Gábornak, hogy egész pályafutásom alatt támogatott és bizalmat szavazott az önálló kutatócsoportom megalakításakor. Köszönetet szeretnék mondani Buday Lászlónak, az Enzimológiai Intézet korábbi igazgatójának azért, hogy a Kutatóközpont átszervezésekor a kutatócsoportomnak helyet adott az általa irányított intézetben, és azért a kedves, de határozott ösztönzésért, amely végül az MTA Doktora pályázatomban elkészítéséhez vezetett.

Hálás vagyok Szabó Pálnak, a Szerkezetkutató Központ vezetőjének a hosszú évek közös munkájáért, aki máig el tud kápráztatni a világos és struktúrált gondolkodásmóddal és munkabírással, amely elengedhetetlen a tömegspektrometriás szerkezetazonosításhoz. Szerencsésnek tartom magam, hogy ha elakadtam a kémia vagy az analitika terén, olyan nagytudású vegyészekhez fordulhattam, mint Szammer János, Jablonkai István, Barta István, Holly Sándor és Czira Gábor, amelyért ezúton is köszönetemet fejezem ki.

Sokat köszönhetek egykori és jelenlegi doktoránsaimnak és MSc hallgatóimnak, akik kemény munkájukkal és fiatalos lelkesedésükkel nagyban hozzájárultak az elért eredményekhez. Külön kiemelném Tamási Violát, Hazai Esztert, Temesvári Mannát, Tóth Katalint, Kiss Ádámot, Déri Mátét, Fekete Ferencet, Mangó Katalint, Incze Evelynt és Minus Annamáriát, akik a mindennapi jelenlétükkel, vidámságukkal élő közösséget teremtettek.

Köszönetet szeretnék mondani az együttműködő kollégáknak, akik megtanítottak az együttgondolkodás inspiráló erejére, Szakács Gergelynek és Füredi Andrásnak (Enzimológiai Intézet), Beke-Somfai Tamásnak és Varga Zoltánnak (Anyag- és Környezetkémiai Intézet), Kóbori

## monostory\_24\_22

Lászlónak és Sárváry Enikőnek (Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinika), Búdi Tamásnak és Garami Miklósnak (SE II. Gyermekklinika), Csukly Gábornak és Bitter Istvánnak (SE Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika), Nagy Andreának és Szever Zsuzsának (Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézet Madarász utcai Gyermekkorház), valamint Hirka Gábornak és Sirok Dávidnak (Toxi-Coop ZRt). Külön köszönöm a közös munkát a nemzetközi együttműködő partnereinknek, elsősorban Damjana Rozman-nek, Ales Belic-nek és Jure Acimovic-nak (University of Ljubljana, Szlovénia), Jean-Marc Pascussi-nek és Patrick Maurel-nek (INSERM, Montpellier, Franciaország), Zdenek Dvorak-nak (Palaczky University, Olomouc, Csehország), Russell Prough-nak (University of Louisville, Louisville KY), Rita Bernhard-nak (Saarland University, Saarbrücken, Németország), valamint Ulrich Zanger-nek és Kathrin Klein-nek (Dr Margarete Fischer-Bosch Institute for Clinical Pharmacology, Stuttgart, Németország).

Köszönetemet szeretném kifejezni az anyagi támogatásokért, külön kiemelve a MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjat, amely nélkül ez a dolgozat biztosan nem készülhetett volna el. Köszönöm mindazoknak, akik átolvasták az értekezést, hogy felhívták a figyelmemet a fogalmazási és helyesírási hibáimra. Köszönettel tartozom Perczel Andrásnak, a MTA Kémiai Osztály elnökének, aki arra biztatott, hogy az értekezés megírása során törekedjek a magyar szavak és kifejezések használatára, ha kell találjak ki magyar megfelelőt az általánosan használt angol helyett. Szánalmasan bevallom, hogy az „intrinsic clearance” kifejezésbe beletört a bicskám. Végül köszönöm Mihucz Viktornak az értekezés és a pályázat elkészítéséhez nyújtott hasznos tanácsait.

## TARTALOMJEGYZÉK

## Rövidítések

<b>1. A kutatási terület háttere.....</b>	<b>1</b>
1.1 Gyógyászati szerek alkalmazásának rövid története.....	1
1.2 A gyógyszerfejlesztés fázisai.....	2
1.3 Farmakokinetikai és gyógyszer-metabolizmus vizsgálatok jelentősége.....	3
1.4 A gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek.....	5
1.4.1 Citokróm P450 enzimek.....	6
1.5 A gyógyszer-metabolizmust befolyásoló tényezők.....	11
1.5.1 Genetikai polimorfizmus.....	11
1.5.2 CYP fenokonverzió.....	13
1.6 A CYP enzimek a gyógyszerbiztonsági vizsgálatokban és a klinikai alkalmazás során.....	16
1.6.1 A gyógyszerjelölt polimorf farmakokinetikai viselkedésének feltérképezése a gyógyszerfejlesztés során.....	17
1.6.2 Farmakokinetikai polimorfizmus a klinikai gyakorlatban.....	18
<b>2. Célkitűzések.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Alkalmazott módszerek.....</b>	<b>21</b>
3.1 Gyógyszerjelöltek és gyógyszer-hatóanyagok.....	21
3.2 Humán minták.....	21
3.3 Az <i>in vitro</i> vizsgálatokban alkalmazott májpreparátumok.....	21
3.4 <i>In vitro</i> farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok.....	22
3.5 Farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatás vizsgálatok.....	22
3.5.1 Enzim-térképezés.....	22
3.5.2 CYP enzim gátlás.....	23
3.5.3 CYP enzim indukció.....	24
3.6 CYP enzimaktivitás meghatározás.....	25
3.7 Genetikai polimorfizmusok és CYP mRNS expresszió meghatározása.....	25
3.8 CYP fehérje expresszió meghatározása („Immunoblot” analízis).....	26
3.9 A dexametazon és a dehidroepiandrosteron CYP-indukáló hatásának meghatározása.....	26
3.10 Gyógyszer-hatóanyagok vérszintjének meghatározása.....	27
3.11 A májszövet donorok és a betegek demográfiai és klinikai adatai.....	27
3.12 Statisztikai analízis.....	27
<b>4. Eredmények.....</b>	<b>28</b>
4.1 Gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedése, metabolizmusa és gyógyszer-interakciós sajátosságai.....	28
4.1.1 Primer májsejt modell alkalmazhatósága <i>in vivo</i> „clearance” becslésre (D1-3).....	29
4.1.2 Gyógyszerjelöltek metabolizmus vizsgálata primer májmodelleken (D2, D4).....	32
4.1.3 Gyógyszer-hatóanyagok metabolizmusát katalizáló enzimek azonosítása (enzim-térképezés) (D2, D5-7).....	34
4.1.4 Paracetamolból történő toxikus metabolit képződésének kivédése CYP aktivitás gátlással (D8).....	37
4.1.5 CYP indukcióra visszavezethető gyógyszer-kölcsönhatások (D2, D3, D9).....	38
4.1.6 Súlyos toxicitáshoz vezető tiamulin-monensin kölcsönhatás hátterének feltárása (D10).....	41
4.1.7 KÖVETKEZTETÉSEK.....	42

4.2	A CYP metabolizmusban mutatkozó különbségek lehetséges okai.....	46
4.2.1	A CYP metabolizmust befolyásoló genetikai és nem-genetikai tényezők azonosítása (D11-16, D20).....	46
4.2.2	A dexametazon és a dehidroepiandroszteron hatása a CYP enzimekre (D17-19).....	54
4.2.2.1	Eltérések a dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP1A enzimek indukciójára gyakorolt hatásában (D17, D18).....	54
4.2.2.2	Hasonlóságok a dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP2 és CYP3 enzimek expressziójára és aktivitására gyakorolt hatásában (D19).....	58
4.2.3	KÖVETKEZTETÉSEK.....	60
4.3	A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított terápia lehetőségei.....	63
4.3.1	A gyógyszer-metabolizáló képesség becslése (CYPtest <sup>TM</sup> ) (D20, D21).....	64
4.3.2	Végstádiumú vesebetegek gyógyszer-lebontó képessége (D21).....	67
4.3.3	Szervátültetésen átesett betegek CYP3A-státuszhoz igazított kalcineurin inhibitor terápiája (D22-24).....	69
4.3.4	A CYP2C9 jelentősége epilepsziás gyermekek valproát terápiájában (D25, D26).....	74
4.3.5	CYP enzimek szerepe pszichiátriai betegek pszichofarmakoterápiájában (D27-29).....	78
4.3.6	KÖVETKEZTETÉSEK.....	85
<b>5.</b>	<b>Összegzés és kitekintés.....</b>	<b>90</b>
<b>6.</b>	<b>Új tudományos eredmények és következtetések.....</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények.....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Az értekezés témájához szorosan kapcsolódó egyéb saját közlemények.....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját közlemények.....</b>	<b>103</b>
<b>10.</b>	<b>Az értekezés témájához kapcsolódó PhD disszertációk.....</b>	<b>107</b>
<b>11.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>107</b>
<b>12.</b>	<b>Függelék.....</b>	<b>125</b>
12.1	A gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP enzimek jelentősebb genetikai polimorfizmusai.....	126
12.2	Farmakokinetikai paraméterek becslése.....	128
12.3	Az EGIS Gyógyszergyár által fejlesztett anxiolitikum, a deramciklan Fázis I. metabolikus útvonalai (S20).....	129
12.4	A <i>p</i> -nitrofenol hidroxiláz és a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin <i>O</i> -demetiláz reakció.....	130
12.5	A paracetamol metabolizmusa.....	131
12.6	A CYP genotípus alapján becsült fenotípus (CPIC ajánlásai alapján).....	132
12.7	A valproát metabolizmusa.....	133
12.8	Az aripiprazol metabolizmusa.....	134
12.9	A klozapin metabolizmusa.....	135
12.10	A klonazepam metabolizmusa.....	136

monostory\_24\_22



**Rövidítések**

AhR	aromás szénhidrogén receptor („aromatic hydrocarbon receptor”)
CAR	konstitutív androsztán receptor
CPIC	Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
CYP	citokróm P450
EFSA	European Food Safety Authorities
EMA	European Medicines Agency
FDA	US Food and Drug Administration
GR	glukokortikoid receptor
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzokinonimin
PCR	polimeráz lánc-reakció („polymerase chain reaction”)
PharmVar	Pharmacogene Variation
PXR	pregnán X receptor
SNP	egyponos nukleotid polimorfizmus („single nucleotide polymorphism”)
tkg	testtömeg kg

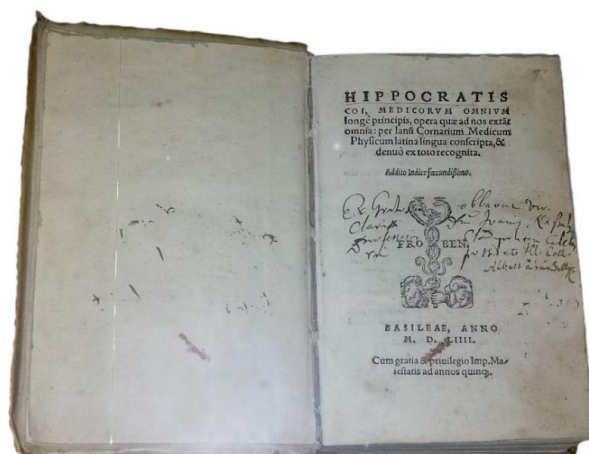
A dolgozatban a gyógyszer-hatóanyagok magyar helyesírására törekedtem, amely valamelyest eltérhet a Pharmindex-ben (<https://pharmindex-online.hu>) található írásmódtól.

monostory\_24\_22

## 1. A KUTATÁSI TERÜLET HÁTTERE

### 1.1 Gyógyászati szerek alkalmazásának rövid története

A gyógyítás története egyidős az emberiség történetével. Az írásos történelem előtti időkből (i.e. 4000 előtt) kevés emlék maradt ránk arról, hogy elődeink milyen gyógymódokat alkalmaztak sérüléseik vagy megbetegedéseik kezelésére, milyen növényi vagy állati eredetű szereket használtak gyógyászati céllal. A régészeti leletek alapján azonban sejthető, hogy az ősi korok embere is alkalmazott egyszerű házi praktikákat, gyógyfüveket kisebb sérülések és egyszerűbb, jól ismert lefolyású megbetegedések kezelésére (Solecki 1975). Míg a súlyosabb eseteknél „szakemberre” – sámánra, varázslóra - volt szükség, aki egyfelől a gyógyító hatású anyagok mélyebb ismeretére, másfelől a varázslatba vetett hitre támaszkodva érhetett el a kívánt hatást. Az ókori orvoslást sok szempontból a tudatosabb gyógyítás jellemezte, kezdve a lenyűgöző anatómiai ismeretektől, a diagnózis felállításán át a gyógykezelésig. Az ókori Egyiptomban nemcsak a mumifikálást művelték magas szinten, de a gyógyítás jeles ismerői is voltak, számos orvosi papiruszon megjelenítve a betegségek tüneteit és a gyógyászati praktikákat. Az egyiptomi ismeretanyagot is felhasználó görög orvoslás legjelentősebb képviselője Hippokratesz (i.e. 460-377) volt, aki kortárs kollégáival a betegségek megfigyelésen alapuló pontos leírását és a tapasztalati úton kialakított gyógymódok bemutatását hagyta az utókorra az orvostudomány majd minden területére kiterjedően (*Corpus Hippocraticum*) (1. ábra) (Iniesta 2011). Elsőként fogalmazta meg a gyógyászat máig érvényes alaptézisét, - „primum nil nocere” (mindenekelőtt ne árts), - amely a mai kor gyógyszerbiztonságra való törekvésének is kiinduló pontja.



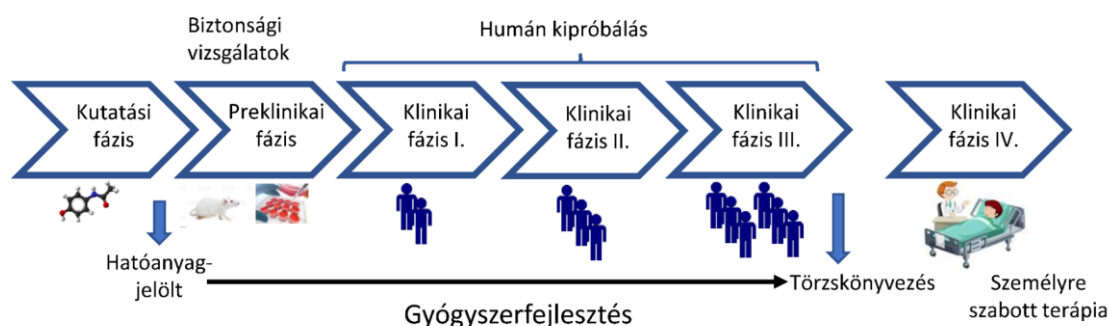
1. ábra: Hippokratesz megbetegedésekről és gyógymódjaikról írott műve, amelyet latin fordításban Basel-ben adtak ki 1554-ben (saját fotó).

Az ókori egyiptomi, görög, de a sumér vagy a kínai gyógyászatból kiinduló, az évszázadok, évezredek során összegyűjtött ismeretanyag vezetett az orvostudomány és a gyógyszerészet

kialakulásához. A patikaszer nélküli időkben a természetben fellelhető, növényi és állati eredetű vagy ásványi anyagokból származó gyógykészítményeket alkalmaztak, amelyek közül jónéhány a mai napig is jelen van a házi patikákban (Petrovska 2012). Bár a gyógyszerészet és az orvostudomány az idők folyamán szükségszerűen szétvált, máig összekapcsolódva, egymást kiegészítve fejlődik. A tapasztalati úton fejlődő gyógyítást a 19. század végén pedig felváltotta a tudatos gyógyszerkutatás (Buchwald 1981). A véletlenen, illetve a megfigyelésen alapuló felfedező munka helyét a szisztematikusan megtervezett, tudományos megalapozottságú gyógyszerkutatás vette át; a farmakológia fejlődésével együtt pedig a Hippokratész által is megfogalmazott biztonságos gyógyszeralkalmazás igénye, sőt követelménye is kialakult.

## 1.2 A gyógyszerfejlesztés fázisai

Az egészséges és patológiás működés sejt- és molekuláris szintű megismerése, a megbetegedésekben meghatározó szerepet betöltő célmolekulák és egyéb faktorok (receptor-fehérjék, enzimek, gének, mutációk stb.) azonosítása, valamint a hatóanyag – fehérje kölcsönhatások folyamatosan bővülő tudásanyaga alapjaiban járul hozzá a felfedező gyógyszerkutatáshoz. Mindez az *in silico* gyógyszertervezéssel és szűréssel, a modern gyógyszerkémiai, valamint az új farmakológiai módszerekkel és betegség-modellekkel karöltve nagyszámú vegyület szisztematikus tesztelését teszi lehetővé. A felfedező gyógyszerkutatás eredményeként a farmakológiai tesztekben ígéretesnek bizonyuló vegyületek biztonságos alkalmazhatóságát és hatékonyságát pedig szigorú hatósági előírások alapján szükséges igazolni (2. ábra) (Hägglöf 2013).



2. ábra: Az originális gyógyszerkutatás, fejlesztés és klinikai nyomon követés fázisai, amelynek során a kutatási fázisban azonosított gyógyszerjelölt biztonságos és hatékony alkalmazhatóságát bizonyítják.

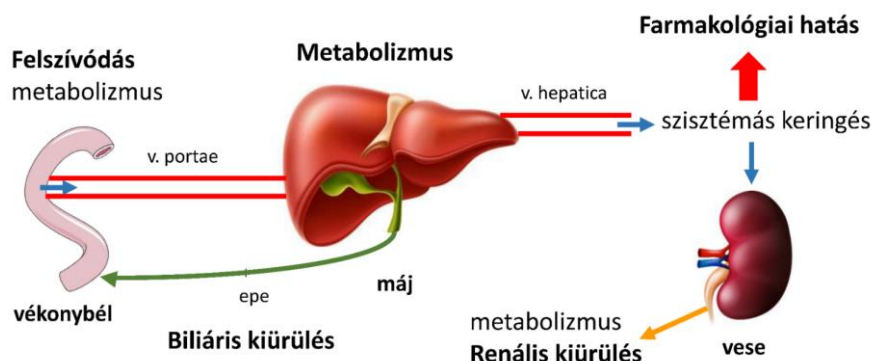
A hosszadalmas gyógyszerfejlesztési folyamat (Rang 2013a; Mohs 2017) preklinikai szakaszában az *in vitro* vizsgálatok és *in vivo* állatkísérletek során a gyógyszerjelöltek farmakokinetikai viselkedését (ADME vizsgálatok – Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination), mellékhatás/toxicitás profilját tárják fel, meghatározzák a képződő metabolitok szerkezetét és a

potenciális metabolikus gyógyszer-kölcsönhatásokra is igyekeznek fényt deríteni. A preklinikai fázisban nyert eredmények többnyire laboratóriumi állatokon (általában patkány, egér, kutya, nyúl, esetleg tengeri malac vagy törpesertés) vagy sejtek és szubcelluláris frakciók alkalmazásával végzett vizsgálatokból származnak. A preklinikai vizsgálatokon kielégítő eredménnyel átjutó gyógyszerjelöltek az emberen való tesztelés fázisába léphetnek. A klinikai vizsgálatok során egészséges önkéntesek, majd betegek bevonásával végzett vizsgálatokban (Klinikai fázis I., II. és III.) történik a gyógyszerjelölt tolerálhatóságának és biztonságos alkalmazhatóságának tesztelése, valamint a hatásosság megerősítése (Shukla 2020). A sikeres klinikai vizsgálatok után megkezdődhet a gyógyszerjelölt törzskönyvezési eljárása, amely Magyarországon az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet hatáskörébe tartozik. A forgalomba hozatal után folytatódik a gyógyszer biztonságos alkalmazásának követése (Klinikai fázis IV.); a mellékhatás bejelentések alapján a hatás módosíthatja a korábbi engedélyt, súlyosabb esetben vissza is vonhatja azt.

Az originális gyógyszerkutatás és fejlesztés idő- és költségigényes folyamat. Az átlagos forgalomba kerülési idő 10-15 év, a költségek pedig a legfrissebb becslések szerint 1,5-2,87 milliárd US\$-t tesznek ki (Rang 2013b; Shukla 2020; Pantaleão 2022). Ezért a tudatosan összehangolt fejlesztési lépések és az időben meghozott, megalapozott döntések a továbbfejlesztés/leállítás kérdésében nagyban hozzájárulnak a költségek racionalizálásához. A felfedező kutatásból a fejlesztési fázisba kerülő 5.000-10.000 vegyület közül csak néhány jut el a betegeken történő klinikai kipróbálásig és mindössze egy kerül forgalomba (Mandagere 2002; Cook 2014; Deore 2019). A tudatos gyógyszerkutatás és fejlesztés az elmúlt évtizedben számos hatékony gyógyszer-hatóanyagot eredményezett. Elég csak a célzott daganatellenes szerekre (lorlatinib, larotrectinib, olaparib, bosutinib, venetoclax), az új antivirális (boceprevir, paritaprevir, grazoprevir, cobicistat) és antibakteriális hatóanyagokra (ceftazidim, avibactam), vagy a központi idegrendszerre ható szerekre (perampanel, fingolimod, kariprazin) gondolnunk (Brown 2021).

### **1.3 Farmakokinetikai és gyógyszer-metabolizmus vizsgálatok jelentősége**

A gyógyszer-hatóanyagok leggyakrabban szájon át történő adagolással jutnak a szervezetbe, a felszívódást követően a keringéssel egyrészt eljutnak a hatás helyére, másrészt eloszlanak a szervek, szövetek között. A gyógyszerek zöme (70-75%) metabolikus átalakuláson megy keresztül, amelynek során a többnyire apoláros vegyületek vízdékonnyabbá válnak és így az epével vagy a vizelettel (ritkábban kilégzéssel, verejtéssel) könnyen ürülnek a szervezetből (3. ábra) (Zanger 2008). A gyógyszer-metabolizmus elsődleges helyszíne a máj, azonban kisebb mértékben egyéb szervekben (pl. bélfal, vese, tüdő, agy stb.) is zajlik a hatóanyagok átalakítása.



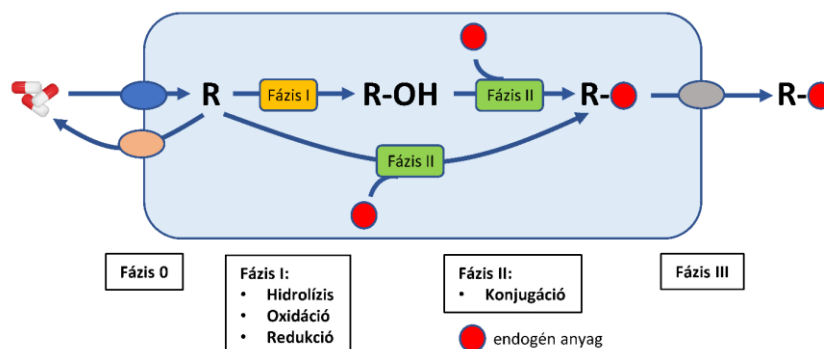
3. ábra: Gyógyszerek sorsa a szervezetben szájon át történő adagolás után.  
v. portae: májkapu véna; v. hepatica: máj véna

A farmakokinetika a szisztémás keringésben kialakuló hatóanyag koncentráció időbeli alakulását vizsgálja, amely jó összefüggésben van a farmakológiai (toxikológiai) hatással. A metabolizmus során a hatóanyagok az esetek többségében elveszítik farmakológiai hatásukat, azonban előfordul, hogy épp a metabolikus átalakulás eredményezi a hatékony vegyületet („prodrug”-ok esetén, pl. klopidozrel, tamoxifen, ciklofoszfamid), vagy a képződő metabolit ugyanolyan (pl. klozapin > *N*-dezmethyl klozapin) esetleg fokozottabb (pl. morfin > morfin 6-*O*-glukuronid) farmakológiai hatással rendelkezik, mint az anyavegyület. Van példa arra is, hogy az anyavegyület hatásától eltérő hatású (pl. toxikus) metabolit képződik (pl. paracetamol > *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin). Mindez rávilágít a farmakokinetikai és gyógyszer-metabolizmus vizsgálatok jelentőségére, amelyek a farmakokinetikai gyógyszer-interakciós vizsgálatokkal kiegészítve a gyógyszerfejlesztés majd minden fázisában (preklinikai és klinikai fázisok) és a forgalomba kerülés után is hozzájárulnak a gyógyszer-hatóanyagok biztonságos alkalmazásához. A gyógyszerfejlesztés során számos gyógyszerjelölt továbbfejlesztése leállításra kerül hatástalanság, mellékhatások vagy kedvezőtlen farmakokinetikai sajátságok miatt. Egy 1991-ben végzett felmérés szerint a klinikai vizsgálatok során történő lemorzsolódás főként (40%-ban) elégtelen farmakokinetikai tulajdonságok és gyenge biohasznosulás miatt következett be, míg a 2000-ben megismételt felmérésben a sikertelenség már csak 11%-ban volt magyarázható farmakokinetikai okokkal, 2010-ben pedig mindössze 1%-ban eredményezte a fejlesztés leállítását (Kola 2004; Khanna 2012). Mindez nagyban köszönhető annak, hogy a nem megfelelő farmakokinetikai sajátságok már a fejlesztés korai szakaszában kiszűrésre, esetleg igazításra kerülnek. A preklinikai farmakokinetikai és gyógyszer-metabolizmus vizsgálatok jelentőségét az is aláhúzza, hogy a fejlesztés korai fázisában felismert kedvezőtlen kinetikai sajátságok a gyógyszerfejlesztés költségeinek csökkentéséhez is hozzájárulnak, hiszen a költségek tetemes részét (hőzavetőlegesen 2/3-át) a klinikai vizsgálatok emészti fel (Rang 2013b). A mindenre kiterjedő

és szisztematikus gyógyszerfejlesztés ellenére a gyógyszer forgalomba kerülését követően sajnálatos módon bekövetkezhet, hogy farmakokinetikai gyógyszer-interakciós okok miatt az engedélyező hatóság visszavonja az engedélyt. Így került visszavonásra a koleszterinszint-csökkentő cerivastatin (Furberg 2001), az antihisztamin terfenadin és asztemizol (Honig 1993; Wisniowska 2016), valamint a reflux kezelésére használt cisaprid (Michalets 2000).

#### 1.4 A gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek

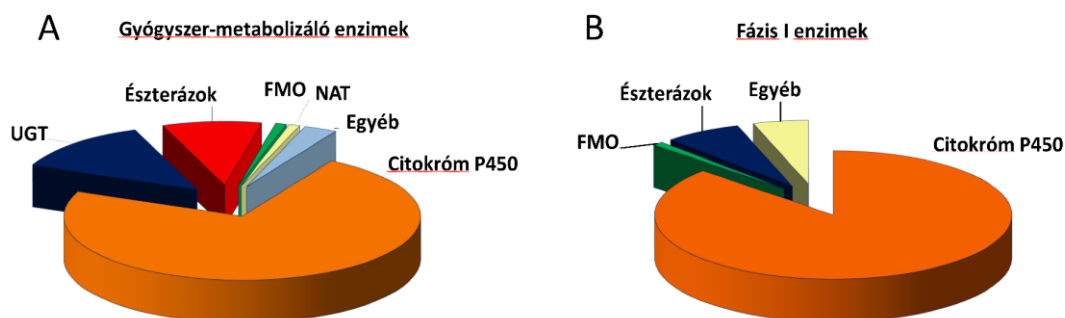
A gyógyszerek sorsa, a szervezetben való biotranszformációja meghatározó mind a farmakológiai hatás, mind a mellékhatások szempontjából. A biotranszformációban, amelynek során a gyógyszer-hatóanyagok kémiai szerkezete megváltozik, számos enzim vesz részt. A gyógyszer-metabolizáló enzimek ugyanakkor egyéb testidegen anyagok (xenobiotikumok: növényvédőszer, tartósítószer, környezetszennyező anyagok stb.), sőt endogén anyagok átalakítását is katalizálják. A testidegen anyagok metabolizmusa és kiürítése egyben védelmet is jelent a szervezetbe jutó kémiai anyagok káros hatásaival szemben, amely a környezethez való alkalmazkodás egyik jelentős összetevője.



4. ábra: A gyógyszerek és egyéb xenobiotikumok biotranszformációja és membrán transzportja. A Fázis I reakciók során funkciós csoport jön létre a vegyületen, míg a Fázis II folyamatok során az anyavegyület vagy a Fázis I metabolit endogén anyaggal konjugálódik a sejtben. A Fázis 0 és Fázis III transzport folyamatoknak a biológiai membránokon való áthaladásban, a felszívódásban és kiürülésben van jelentősége.

A gyógyszer-metabolizmus enzimatisz átalakulások sorozata, amelyet két csoportra oszthatunk (Ioannides 2001). A Fázis I folyamatokban az anyavegyületen funkciós csoport (pl. -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH) jön létre, míg a Fázis II reakciók során az anyavegyület, vagy a Fázis I metabolit(ok) konjugációja történik a szervezet endogén anyagaival (pl. glükuronsav, glutation, szulfát, aminosav, acetyl-, metil-csoport) (4. ábra). A farmakokinetikai viselkedést tekintve további fázisokat is megkülönböztetünk (Fázis 0, Fázis III), amelynek során kémiai átalakulás nem történik, mégis a felszívódás és kiürülés, a biológiai membránokon való áthaladás szempontjából meghatározó lépések (Krajcsi 2013). A Fázis 0 és Fázis III folyamatokban szerepet játszó

transzporterek megemlítése lényeges, azonban a transzporter fehérjék nem képezik a dolgozat tárgyát, ezért részletesebb ismertetésüktől eltekintek.



5. ábra: A gyógyszer-metabolizáló enzimek (A), ezen belül a Fázis I reakciókat katalizáló enzimek (B) szerepe a gyógyszer-hatóanyagok metabolizmusában (Zanger 2008; Guengerich 2015).

UGT: UDP-glukuronil transzferázok; FMO: flavin monooxigenázok; NAT: *N*-acetyl transzferázok

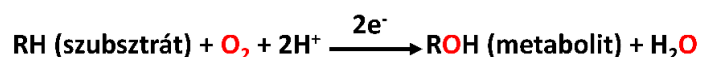
A gyógyszer-hatóanyagok kisebb hányada (20-25%) változatlan formában távozik a szervezetből; azok, amelyek biotranszformációt követően ürülnek ki, zömmel a citokróm P450 enzimek működésének köszönhetően alakulnak át (5. ábra). Rangos szerepük és a dolgozat fókusza miatt a citokróm P450 enzimeket részletesen mutatom be (1.4.1 fejezet). A gyógyszer-metabolizmus enzimeit közül meg kell még említeni a Fázis I reakciókat katalizáló flavin monooxigenázokat, észterázokat, alkohol és aldehid dehidrogenázokat, aldehid oxidázokat, monoamin oxidázokat, epoxid hidrolázokat, valamint a Fázis II konjugációs enzimeket, mint az UDP-glukuronil transzferázokat, szulfotranszferázokat, glutation *S*-transzferázokat, *N*-acetyl transzferázokat és metil-transzferázokat, azonban terjedelmi okok miatt nem térek ki az ismertetésükre.

#### 1.4.1 Citokróm P450 enzimek

A gyógyszer-metabolizmusban, valamint közvetve a gyógyszerválasz (farmakológiai főhatás és/vagy a mellékhatás) kialakulásában központi jelentősége van a citokróm P450 (CYP) enzimeknek. Általánosan elterjedt enzimek, növény-, állat-, gomba- és baktériumfajokban is kimutathatók; az eukariota sejten belül a sima felszínű endoplazmás retikulum és a mitochondrium membránjához kötötten találhatóak. Hem-tartalmú enzimek, az aktív centrumban a hem egy cisztein kénatomján keresztül kapcsolódik az enzimfehérjéhez. Elnevezésük onnan adódik, hogy a redukált állapotú enzim szénmonoxiddal képzett komplexe 450 nm-nél jellegzetes abszorpciós maximumot mutat (Omura 1964). A CYP enzimeket a flavin monooxigenázokkal együtt a monooxigenázok közé soroljuk; ahogy az elnevezésből is kitetszik, a molekuláris oxigénből csak az egyik oxigént építik be a szubsztrátba, a másik a kísérő reakcióban vízzé alakul. A monooxigenázok működésükhöz elektron-donorként NADPH-t (nikotinamid-adenin-dinukleotid-



foszfát) igényelnek (6. ábra) (Guengerich 2008). A flavin monooxygenázokkal ellentétben, a CYP enzimek nem képesek az elektront közvetlenül a NADPH-ról fogadni, a katalitikus reakció során elektron-transzportot létrehozó redukáló enzimre (NADPH-citokróm-P450-oxidoreduktáz) van szükség, amellyel multienzim komplexet képeznek (Hannemann 2007). Egyes CYP enzimek (pl. CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4) képesek elektront fogadni a NADH > citokróm b<sub>5</sub> > NADH-citokróm b<sub>5</sub>-reduktázon keresztül is (Duarte 2005; Yoo 2019); az első elektront azonban kizárólag a NADPH-citokróm-P450-oxidoreduktáztól, míg a második elektront mindkét redukáló partnertől fogadhatja az enzim.



6. ábra: Citokróm P450 enzimek katalitikus reakciója (egyszerűsített séma).

A gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimek szerkezetileg nagyon eltérő kémiai anyagok átalakítását és változatos reakciókat (alifás és aromás hidroxilezés, *N*- és *O*-dealkilezés, *N*- és *S*-oxid képzés, epoxid képzés, nitro-redukció) katalizálnak. Általánosan jellemző, hogy átfedő szubsztrát- és reakció-specifitást mutatnak, vagyis 1) ugyanazt a vegyületet több CYP izoenzim is képes átalakítani, 2) ugyanazt a reakciót több CYP izoenzim is képes katalizálni; sőt egy vegyület metabolizmusa során ugyanaz az enzim több metabolit képződéséért is lehet felelős. Ugyanakkor bizonyos fokú szelektivitás is megfigyelhető az egyes CYP enzimeknél (1. táblázat), amely kihasználható a gyógyszer-interakciók feltárása során.

A CYP szuperfamilia tartozó enzimeket aminosav-sorrend homológia alapján családokba és alcsoportokba soroljuk (Nelson 2006, <https://drnelson.uthsc.edu>). A legalább 40%-os aminosav-szekvencia hasonlóságot mutató enzimek azonos családba, míg az 55% vagy ennél magasabb homológiát mutató enzimek azonos alcsoportba tartoznak. A családokat arab szám jelöli a CYP rövidítés után (pl. CYP2), az alcsoportokat nagybetű (pl. CYP2D), míg az egyedi enzimet egy további arab számmal jelöljük (pl. CYP2D6). A humán genomban 57 CYP gént és 58 pszeudogént azonosítottak, azonban csak alig egy tucat enzim vesz részt a gyógyszerek és egyéb xenobiotikumok metabolizmusában (1. táblázat, 7. ábra) (Zanger 2013).

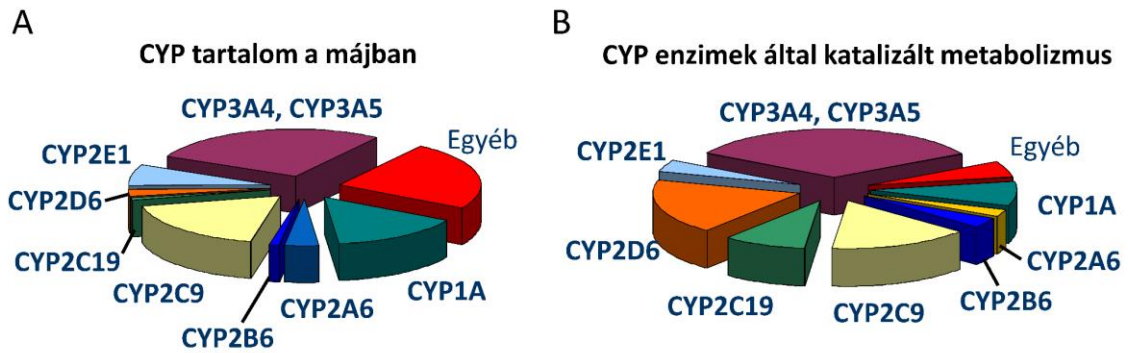
Az egyes szövetekben, szövetekben a CYP izoenzim expressziója eltérő lehet (1. táblázat). Jó példa erre az azonos alcsoportba tartozó CYP1A1 és CYP1A2. A CYP1A2 főként a májban fejeződik ki, egyéb szövetekben nem, vagy csak igen alacsony koncentrációban, addig a CYP1A1 expressziója inkább az extrahepatikus szövetekre jellemző és a májban alap állapotban csak nyomokban mutatható ki. A májban mint a gyógyszer-metabolizmus elsődleges helyszínén az egyes CYP enzimek megoszlása ugyancsak eltérő, legnagyobb koncentrációban a CYP3A enzimek fejeződnek ki (a teljes CYP tartalom közel 30%-a), míg a CYP2C19 és CYP2D6

## monostory\_24\_22

1. táblázat: A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő humán CYP enzimek szöveti kifejeződése, szubsztrátjaik (példák) és specifikus reakcióik.

CYP	Szöveti expresszió	Szubsztrát	Specifikus reakció
CYP1A1	extrahepatikus szövetek: tüdő, vese, gyomor-bél traktus, bőr májban <1%	policiklusos aromás szénhidrogének, erlotinib	
CYP1A2	máj, vastagbél, leukociták	policiklusos aromás szénhidrogének, olanzapin, klozapin, duloxetin, takrin koffein, teofillin	fenacetin <i>O</i> -deetiláz
CYP2A6	máj, tüdő	nikotin, kumarin, tegafur	kumarin 7-hidroxiláz
CYP2B6	máj, tüdő, gyomor-bél traktus, leukociták	efavirenz, ifoszfamid, ciklofoszfamid, bupropion, ketamin, metadon	bupropion hidroxiláz, <i>S</i> -mefenitoin <i>N</i> -demetiláz
CYP2C8	máj	paklitaxel	paklitaxel 6 <i>a</i> -hidroxiláz
CYP2C9	máj, tüdő, gyomor-bél traktus, leukociták	warfarin, acenokumarol, valproát, diklofenak, ibuprofen, gliburid, tolbutamid, losartan, irbesartan	tolbutamid 4-hidroxiláz diklofenak 4'-hidroxiláz
CYP2C19	máj, tüdő, gyomor-bél traktus, leukociták	omeprazol, diazepam, proguanil, trimetoprim, szulfametoxazol, klopidogrel	<i>S</i> -mefenitoin 4'-hidroxiláz
CYP2D6	máj, tüdő, gyomor-bél traktus, vese, leukociták	metoprolol, propranolol, kodein, fluoxetin, aripiprazol, risperidon, tamoxifen	bufuralol 1'-hidroxiláz dextrometorfan <i>O</i> -demetiláz
CYP2E1	máj, tüdő	etanol, kloroform, izofluran	klórzoxazon 6-hidroxiláz
CYP3A4	máj, gyomor-bél traktus, vese, leukociták	ciklosporin, takrolimusz eritromicin,	
CYP3A5	máj, tüdő, gyomor-bél traktus, vese	klaritromicin klonazepam, lidokain, nifedipin, midazolam	midazolam 1'- és 4-hidroxiláz nifedipin oxidáz

Rendic 1997 és 2002; Lewis 2001; Guengerich 2015 alapján



7. ábra: A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő legjelentősebb humán CYP enzimek.  
 A) Az egyes CYP izoenzimek megoszlása a májban, B) a CYP enzimek által átalakított gyógyszer-hatóanyagok aránya.

kevesebb mint 2%-ban fordul elő (7.A ábra) (Achour 2014; Guengerich 2015). A CYP enzimek gyógyszer-hatóanyagok metabolizmusában betöltött szerepe is eltérő. A legtöbb hatóanyag (37%) átalakítását a CYP3A enzimek katalizálják, ezt követi a CYP2C9 (17%), míg az alacsony máj expressziót mutató CYP2C19 és CYP2D6 enzim is nagyszámú hatóanyag (10-12% és 15-20%) metabolizmusáért felelős (7.B ábra) (Wienkers 2005; Zanger 2008, 2013).

A CYP1A alcsaládba tartozó két enzimnek (CYP1A1, CYP1A2) számos közös és eltérő sajátossága van. Szubsztrátjaik között található policiklusos aromás szénhidrogének, gyógyszer-hatóanyagok és endogén vegyületek is. A CYP1A enzimek kettős szerepet töltenek be a testidegen anyagok metabolizmusában; egyrészt gyógyszer-hatóanyagokat inaktívnak, másrészt prokarcinogén anyagok metabolikus aktiválását is végzik. Míg a CYP1A2 számos gyógyszer-hatóanyag (pl. xantin-származékok, egyes pszichofarmakonok) átalakítását katalizálja, a CYP1A1 enzimre kevésbé jellemző, hogy gyógyszervegyületek metabolizmusában venne részt (1. táblázat). Ugyanakkor mindkét enzim működése meghatározó a policiklusos aromás szénhidrogének, heterociklusos aromás aminok és amidok bioaktiválásában, amelyek például a cigaretta füstben, a füstölt, grillezett vagy elégett ételben található, továbbá a környezetszennyező poliklórozott bifenilek és dibenzodioxinok reaktív vegyületekké történő átalakításában. A reaktív metabolitok DNS- vagy fehérje-adduktot képeznek és toxikus vagy karcinogén folyamatokat indítanak (Rendic 2012 és 2021).

A legtöbb gyógyszer-metabolizáló CYP enzim a népes CYP2 családba tartozik, amelyek szerkezetileg igen eltérő gyógyszer-hatóanyagok, környezeti kemikáliák és endogén szubsztrátok átalakításáért felelősek, kezdve a kisméretű valproáttól a bonyolultabb szerkezetű paklitaxelig. A CYP2A6 a nikotin és néhány gyógyszervegyület (pl. kumarin és származékai, letrozol, pilokarpin) metabolizmusát, valamint a „prodrug” tegafur és prokarcinogén anyagok (aflatoxin B1, cigaretta füstben lévő nitrozaminok) aktiválását katalizálja (Tanner 2017). A CYP2B6 is viszonylag

kisszámú, de klinikailag fontos hatóanyag (pl. efavirenz, bupropion, ketamin, metadon) átalakítását, a daganat-terápiában alkalmazott „prodrug”-ok (ciklofoszfamid, tiotepa) metabolikus aktiválását végzi, valamint környezetszennyező anyagok karcinogén aktiválásában is részt vesz (pl. aflatoxin B1, 6-aminokrizen) (Turpeinen 2006; Rendic 2012). A CYP2C alcsaládkhoz sorolt enzimek aminosav-szekvenciája nagyobb mint 82%-os hasonlóságot mutat, mégis az egyes enzimek szubsztrát-specifitásban és a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepükben jelentős különbségek figyelhetők meg. A CYP2C9 szubsztrátok enyhén savas karakterű vegyületek (pl. warfarin, valproát, diklofenak, ibuprofen, celecoxib, fenitoin, losartan), míg a CYP2C19 szubsztrátok semleges vagy gyengén bázikus molekulák. A CYP2C19 végzi a proton-pumpa gátlók (omeprazol, pantoprazol), pszichofarmakonok (diazepam, flunitrazepam, moklobemid) metabolikus inaktiválását és a klopidozrel, proguanil aktiválását (Rendic 2002; Zhou 2009a; Niwa 2012). Ugyan a CYP2C8 és a CYP2C9 bizonyos mértékig átfedő szubsztrát-specifitást mutat, néhány hatóanyag (paklitaxel, klorokin, pioglitazon) metabolizmusában a CYP2C8 enzimnek van elsődleges szerepe (Lai 2009). A CYP2C enzimek aktivitása meghatározó az endogén arachidonsav biotranszformációjában, míg a CYP2C19 részt vesz a progeszteron és a melatonin metabolizmusában (Zhou 2009a). A CYP2D6 imponáló szubsztrát-körrel rendelkezik, számos gyógyszervegyület metabolizmusát domináns enzimként katalizálja (Zhou 2009b; He 2015). Csak néhányat említve a teljesség igénye nélkül, kardiovaszkuláris szerek (pl. bufuralol, metoprolol, propranolol, propafenon), központi idegrendszerre ható gyógyszerek (risperidon, aripiprazol, haloperidol, venlafaxin, paroxetin, fluoxetin, imipramin), antihisztaminok (loratidin, prometazin), vagy a daganat-terápiában alkalmazott ösztrogén receptor modulátor tamoxifen, valamint az opiát kodein és tramadol. A CYP2D6 enzimmel szemben, a CYP2E1 csak néhány gyógyszer-hatóanyag (paracetamol, klórozoxazon) átalakításában játszik szerepet, szubsztrátjai inkább kis molekulatömegű szerves oldószerek (etanol, aceton) és prokarcinogén vegyületek (kloroform, szén-tetraklorid, dietil-nitrozamin) (Rendic 2012).

A gyógyszer-hatóanyagok közel felét metabolizáló CYP3A enzimek aktív centruma nagy és flexibilis, amely alkalmassá teszi arra, hogy méretében és szerkezetileg is óriási különbséget mutató vegyületeket alakítsanak át (Sevrioukova 2013). A kisebb méretűek között említhetjük a nifedipint, benzodiazepineket (midazolam, klonazepam), sztatinokat (szimvasztatin, atorvasztatin), míg a nagyméretű CYP3A szubsztrátok közé tartozik a ciklosporin és takrolimusz, az eritromicin és klaritromicin, a szirolimusz és everolimusz (Fujino 2021). A CYP3A alcsaládba tartozó enzimek közül a CYP3A4 és CYP3A5 enzimekre átfedő szubsztrát-specifitás jellemző, azonban szubsztrát-függő különbségek is kimutathatók (Huang W 2004). Jó példa erre a takrolimusz, amely ugyan mindkét enzim szubsztrátja, azonban a CYP3A5 nagyobb

hatékonysággal alakítja át, mint a CYP3A4 (Kamdem 2005; Rodriguez-Antona 2022). Ezzel szemben az eritromicin és klaritromicin metabolizmusát a CYP3A4 nagyobb hatékonysággal katalizálja, mint a CYP3A5 (Williams 2002; Huang W 2004). Szép számmal vannak olyan endogén anyagok (koleszterin, epesavak, arachidonsav), hormonok (kortizol, tesztoszteron, ösztradiol, dehidroepiandroszteron), vagy a D-vitamin, amelyek metabolizmusában a CYP3A enzimek is részt vesznek és ezzel hozzájárulnak az endogén anyagok homeosztázisának fenntartásához (Fujino 2021).

### **1.5 A gyógyszer-metabolizmust befolyásoló tényezők**

A gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek aktivitása nemcsak a gyógyszerfejlesztés szempontjából, de a forgalomba hozatal után a betegeken történő alkalmazás során is nagy jelentőségű. A gyógyszer-metabolizáló enzimekre ugyan jellemző a széles és átfedő szubsztrát-specifitás, mégis klinikailag releváns koncentrációban a hatóanyagok zöménél az átalakítást egy, vagy csak néhány enzim katalizálja. A metabolizmusban meghatározó szerepet játszó enzimek ismerete, valamint az enzim-expressziót és működést befolyásoló tényezők feltérképezése hozzájárul a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésében mutatkozó egyéni eltérések feltárásához, valamint a személyre szabott terápia kialakításához. Az eltérések számos tényezőre vezethetők vissza: 1) a Fázis I és Fázis II enzimekre, de különösen a CYP enzimekre jellemző nagyfokú genetikai polimorfizmusra, 2) és a nem-genetikai tényezőkre (belső tényezők: életkor, nem, hormonális állapot, megbetegedések; külső tényezők: gyógyszeres kezelés, táplálkozás, alkoholfogyasztás, dohányzás), amelyek csökkent vagy éppen fokozott enzimaktivitást eredményezhetnek (Zanger 2013; Shah 2016; Kantae 2017; Waring 2020; **S17**; **S23**). Mindezek eredőjeként a populációban eltérő gyógyszer-metabolizáló fenotípus csoportokat különíthetünk el (Ingelman-Sundberg 2007); a legújabb terminológia szerint megkülönböztetünk gyenge, intermedier, normál és gyors/ultragyors metabolizáló fenotípusokat (Caudle 2017). A következő fejezetekben a gyógyszer-metabolizmus szempontjából meghatározó CYP enzimek (CYP1, CYP2, CYP3 enzim-család) aktivitásában jelentkező inter-individuális különbségek lehetséges okaira térek ki.

#### **1.5.1 Genetikai polimorfizmus**

A CYP enzimek genetikai polimorfizmusai jelentős eltéréseket okozhatnak a szubsztrát-hatóanyagok vérszintjében, és így befolyásolják a gyógyszerhatékonyságot és a mellékhatások kialakulását. A funkció-vesztő allélvariánsok következménye a csökkent vagy teljesen hiányzó CYP enzimaktivitás, míg a funkció-fokozó allélvariánsok emelkedett aktivitást eredményeznek, amely növelheti a nem-kívánt hatások kockázatát vagy hatás-elmaradáshoz vezethet

(Függelék 12.1) (Cavallari 2011; Zhou 2017). Nagyszámú CYP allélvariáns és alvariáns került azonosításra, ugyanakkor komoly klinikai következményeket lényegesen kevesebbnél írtak le (Zanger 2014; **S17**). Például a CYP2D6 esetén már 149 allélvariánst azonosítottak, de mindössze egy tucat allélhoz köthető klinikailag releváns CYP2D6 aktivitás-változás, míg a CYP1A2 és CYP3A4 enzimek polimorfizmusai kevésbé jutnak érvényre az egyéb nem-genetikai tényezők mellett. A CYP allélvariánsok többnyire egy vagy több egy pontos nukleotid polimorfizmust (SNP, „single nucleotide polymorphism”) hordoznak. Az SNP-k létrejöhetnek nukleotid cserével, nukleotid kieséssel (deléció) vagy beékelődéssel (inzerció), a helyét tekintve pedig előfordulnak a kódoló (exon régió) vagy nem-kódoló részeken (intron régiók és szabályzó területek) is. Továbbá ismertek CYP gén kópiaszám változást (teljes gén-deléció vagy duplikáció/multiplikáció) eredményező polimorfizmusok is (pl. CYP2D6). Az allélvariánsokat a CYP gén név után \*-gal és számmal, az alvariánst pedig nagybetűvel jelöljük (pl. CYP2D6\*4 és CYP2D6\*4D). „Vad-típusú” variánsnak azt az allélvariánst tekintjük, amely a legnagyobb arányban fordul elő az emberi populációban és működőképes enzimet kódol. A vad-típusú allélvariánsokat \*1-el jelöljük, míg a polimorf allélvariánsok az azonosítás időbeli sorrendjében növekvő sorszámot kapnak. A gyógyszer-metabolizáló CYP enzimeknél azonosított allélvariánsokkal és változatokkal kapcsolatos információk összegyűjtve és folyamatosan frissítve fellelhetők a Pharmacogene Variation Consortium (PharmVar) által létrehozott adatbázisban (Gaedigk 2018; <https://www.pharmvar.org>).

A CYP allélvariánsok előfordulási gyakorisága jelentősen eltérhet a kaukázusi, ázsiai és afrikai/afro-amerikai populációkban, amelyről szintén találunk információt a PharmVar adatbázisban. Az etnikai eltérésekkel kapcsolatban két érdekességet szeretnék említeni. A CYP2D6 gén duplikációja/multiplikációja, amely fokozott (ultra-gyors) CYP2D6 aktivitáshoz vezet, nagy gyakorisággal fordul elő az afrikai populációban, különösen az észak-kelet afrikai populációban (Teh 2012). Az emelkedett aktivitás a toxikus növényi alkaloidok fokozott metabolizmusát vonja maga után és egyben növeli a biztonsággal elfogyasztható növényi táplálék mennyiségét a CYP2D6 duplikációt hordozó személyek számára, amely nem elhanyagolható előny, különösen a táplálék-szegény időszakokban. Meg kell jegyezni, hogy szemben más CYP enzimekkel, a CYP2D6 nem indukálható a klasszikus értelemben, azaz nem jellemző, hogy a CYP2D6 gén transzkripciója xenobiotikum hatására megemelkedne. A CYP2D6 gén kópiaszám-növekedése valószínűleg szelekciós nyomásra következett be, hiszen a fokozott CYP2D6 aktivitás következtében a növényi toxinok felgyorsult hatástalanítása a túlélést segítette (Ingelman-Sundberg 2005). Markáns különbség figyelhető meg szintén a működőképes CYP3A5 enzimet kódoló, vad-típusú CYP3A5\*1 előfordulási gyakoriságában is. Az őssinek tekintett CYP3A5\*1 allél

az afrikai populációban 60-75%-ban van jelen, míg az ázsiai populációkban 25-35%-ban, a kaukázusi népcsoportoknál mindössze 5-12%-ban fordul elő (Zanger 2013; Zhou 2017). Az aktív *CYP3A5\*1* allél kimagasló előfordulási arányát az afrikai populációban azzal magyarázzák, hogy a *CYP3A5* enzim által katalizált kortizol > 6 $\beta$ -hidroxikortizol átalakulásnak meghatározó szerepe van a só- és víz-háztartás szabályzásában, ami különösen lényeges az egyenlítő környéki forró éghajlati körülmények között (Bains 2013). A világ többi területein a funkció-vesztő *CYP3A5\*3* allél elterjedése a kiegyenlítettebb éghajlati viszonyoknak köszönhetően nem jelentett komolyabb hátrányt a populáció számára. A Függelék 12.1 táblázatában ismertetem a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló, klinikai szempontból is lényeges *CYP* allélvariánsokat, amelyekkel a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások kutatócsoportban mélyebben is foglalkozunk.

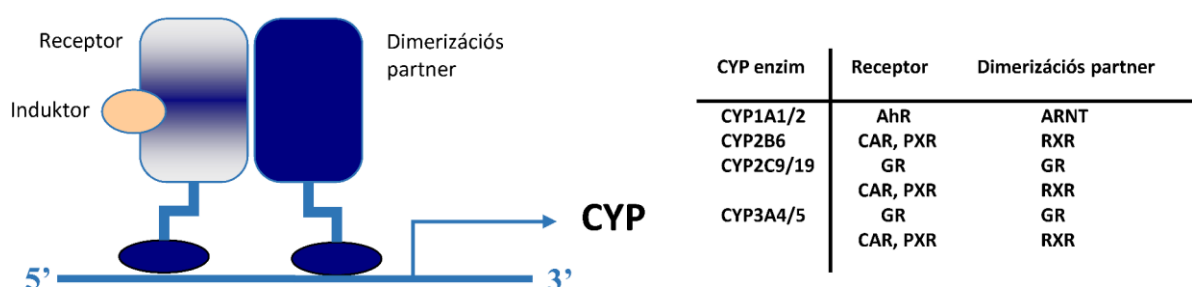
A gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek örökletes variabilitásának felismerésével szükségszerűen megszületett az igény, majd a hatósági és társadalmi elvárás, hogy tekintetbe vegyük a genetikai variánsokat mind a gyógyszerfejlesztés, mind a személyre szabott gyógyszeres terápia kialakítása során (Ingelman-Sundberg 2010; van der Wouden 2017; Shekhani 2020). Egy 2020-ban megjelent tanulmány szerint a Magyarországon forgalomban lévő gyógyszer-hatóanyagok közül 165-nél jelenik meg farmakogenetikai információval kapcsolatos ajánlás (Varnai 2020). Az ajánlások 46%-ban a gyógyszer-metabolizáló enzimekre vonatkoznak, amelyek közül a *CYP* enzimek előkelő 67,6% arányt képviselnek. Nem újkeletű törekvés, hogy a beteg *CYP* genotípusa alapján becsüljük a gyógyszer-metabolizáló fenotípust, amely támpontot jelenthet a gyógyszer terápiás vérszintjéhez szükséges dózisirány meghatározásához (Swen 2018).

### 1.5.2 *CYP* fenokonverzió

A *CYP* enzimekhez kötött gyógyszer-metabolizmusban mutatkozó egyéni különbségek csak részben magyarázhatók a genetikai variabilitással. A *CYP* genotípus alapján becsülhető fenotípus számos nem-genetikai tényezőnek köszönhetően módosulhat, amely a *CYP* enzimek fenokonverziójához vezet (Shah 2015a). A *CYP* genotípus-fenotípus eltérés („mismatch”) visszavezethető: 1) olyan belső tényezőkre, mint az életkor, a nem, vagy a megbetegedések, 2) valamint külső környezeti tényezőkre, mint a gyógyszeres kezelés, táplálkozás, alkoholfogyasztás, vagy a dohányzás (Shah 2015a és 2016; Klomp 2020; Hahn 2021).

Az életkor gyógyszer-metabolizmusra gyakorolt hatása régóta ismert, bár az egyes *CYP* enzimek expressziójában és aktivitásában eltérő mintázatot figyeltek meg magzati, újszülött, gyermek és időskorban (Tanaka 1998; de Wildt 2014). A *CYP* enzimek egy része azonos expressziót mutat a különböző életkorokban (pl. *CYP3A5*), mások magzati korban (pl. *CYP3A7*), illetve születés után (*CYP2E1*, *CYP3A4*) expresszálódnak főként, míg idős korban általában csökken a *CYP* enzimek aktivitása (de Wildt 2014). A gyógyszer-metabolizmusban és a *CYP* expresszióban mutatkozó

nemek közti különbség már nem ennyire egyértelmű. Több vizsgálat is igazolta, hogy nőknél a CYP3A4 fokozottabban fejeződik ki a májban, mint férfiaknál, valamint a CYP2C9 és CYP2D6 enzimek azonos mértékben expresszálódnak nőknél és férfiaknál, azonban a CYP1A2, CYP2B6 és CYP2C19 enzimek esetén a nemek közti különbség megkérdőjelezett (Anderson 2008; Scandlyn 2008; Achour 2014). A belső tényezők közül a megbetegedések sok esetben negatívan befolyásolják a CYP enzimek expresszióját és a gyógyszer-metabolizáló képességet. Fertőzések megbetegedések esetén, gyulladással járó patofiziológiai állapotokban, vagy daganatos megbetegedésekben a gyulladáscsökkentő citokinek (pl. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IFN) fokozott termelődése a CYP enzimek expresszióját visszaszorítja, bár az aktivitás/expresszió változás mértéke eltérhet az egyes CYP enzimeknél (Aitken 2007; Christensen 2012; Burns 2014; Shah 2015b; Lenoir 2021). A gyógyszeres kezelés, vagy egyéb xenobiotikum expozíció hatására a genetikailag meghatározott CYP aktivitás megváltozhat, és a bekövetkező CYP fenokonverzió két irányú lehet: 1) CYP enzim indukciót, növekedett CYP expressziót és aktivitást okozhat, 2) valamint gátolhatja a CYP enzim működését (Tornio 2019; Klomp 2020). A CYP enzimek indukciója az esetek többségében receptor-mediált folyamat (Hakkola 2020; **S15**). A folyamat leegyszerűsítve a következő lépésekből áll: 1) az induktor közvetlenül kötődve, vagy közvetett módon aktiválja a citoszolban



8. ábra: A CYP enzimek indukciójában részt vevő receptorok kötődése a *CYP* gén promóter régiójában lévő szabályzó elemekhez.

AhR: aromás szénhidrogén receptor, CAR: konstitutív androsztán receptor, PXR: pregnán X receptor, GR: glukokortikoid receptor, ARNT: AhR nukleáris transzlokátor, RXR: retinoid X receptor

lévő receptort, 2) az aktivált receptor a sejtmagba lép és a megfelelő dimerizációs partnerhez kötődik, 3) a kialakult homo- vagy heterodimer az adott CYP gén promóter régiójában lévő, receptor-kötő helyhez kapcsolódik és a *CYP* gén transzkripcióját idézi elő (8. ábra) (Manikandan 2018). A folyamatban részt vevő receptorok ún. xenobiotikum érzékelő receptorok, amelyek nukleáris receptor vagy bHLH-PAS (basic-helix-loop-helix Per-Arnt-Sim) fehérjék. A CYP1 enzimek indukciójában közreműködő bHLH-PAS receptor az aromás szénhidrogén receptor (AhR), míg a CYP2 és CYP3 enzimek indukciója nukleáris receptorok, a pregnán X receptor (PXR, NR1I2), konstitutív androsztán receptor (CAR, NR1I3) és a glukokortikoid receptor (GR,



NR3C1) közreműködésével történik (Hakkola 2018). Az AhR, PXR és GR receptorokhoz közvetlenül kötődik az aktiváló ligand, míg a CAR aktiválása során az induktor foszforiláció-defoszforilációs kaszkádot indít el. A receptor aktiválása lehetővé teszi, hogy a sejtmagba lépjen, ahol az AhR, PXR és CAR heterodimert képez az ARNT-al (AhR nukleáris transzlokátor) vagy az RXR-al (retinoid X receptor), míg a GR homodimerizálódik, amely végül a *CYP* gén fokozott átíródásához vezet (Pascussi 2008; Gotoh 2015). Az ismertett indukciós mechanizmusok okozzák a CYP1A, CYP2B6, CYP2C és CYP3A enzimek fokozott expresszióját. Ugyanakkor a CYP2E1 indukciója poszt-transzkripciós szinten, az enzim fehérje stabilizálásával jön létre (Hakkola 2020). A CYP2D6 pedig a jelenlegi ismeretek szerint testidegen anyagokkal nem indukálható.

2. táblázat: Példák a humán CYP enzimek aktivitását befolyásoló, CYP fenokonverziót kiváltó hatóanyagokra. Az *in vitro* farmakokinetikai gyógyszer-interakciók vizsgálatokor alkalmazott CYP-szelektív induktorokat és gátlószereket vastagítva jelöltem.

CYP	CYP induktor <sup>a</sup>	CYP gátlószere <sup>a</sup>
CYP1A2	<b>metilkolantrén,</b> omeprazol, <b>TCDD<sup>b</sup>,</b>	ciprofloxacín, duloxetin, fluvoxamin, <b>furafillin, <math>\alpha</math>-naftoflavon</b>
CYP2A6	<b>fenobarbitál</b>	<b>metoxipsoralen</b>
CYP2B6	efavirenz, fenitoin, <b>fenobarbitál,</b> karbamazepin, midazolam, <b>rifampicin</b>	<b>pentoxi-resorufin,</b> sertralin, <b>tioTEPA</b>
CYP2C9	fenitoin, <b>fenobarbitál,</b> karbamazepin, <b>rifampicin</b>	flukonazol, mikonazol, <b>szulfafenazol</b>
CYP2C19	fenitoin, <b>fenobarbitál,</b> <b>rifampicin</b>	flukonazol, fluvoxamin, modafinil, omeprazol, tiklopidin, <b>tranilcipromin</b>
CYP2D6	-	duloxetin, fluoxetin, <b>kinidin,</b> paroxetin
CYP2E1	etanol, <b>izoniazid</b>	<b>diszulfiram,</b> <b>dietyl-ditiokarbamát,</b> 4-metilpirazol
CYP3A4/5	<b>dexametazon,</b> fenobarbitál, karbamazepin, prednizolon, metilprednizolon, <b>rifampicin</b>	boceprevir, itrakonazol, <b>ketokonazol,</b> klaritromicin, <b>troleandomicin,</b> ritonavir, verapamil, vorikonazol

<sup>a</sup>Polasek 2011; Hukkanen 2012, Hakkola 2020; <https://drug-interactions.medicine.iu.edu>;

<sup>b</sup>2,3,7,8-tetraklór-dibenzodioxin

A gyógyszer-hatóanyagok és egyéb xenobiotikumok által kiváltott CYP indukció megnövekedett CYP expresszióhoz és aktivitáshoz (2. táblázat), illetve az adott CYP enzim szubsztrátjainak fokozott átalakításához és eliminációjához vezet, amely a gyógyszerhatás elmaradását, vagy „prodrug”-ok esetén az aktív metabolit fokozott képződését okozza, ami nem-kívánt hatást válthat ki.

A farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások másik fő mechanizmusa a CYP enzim-működés aktiválása vagy gátlása. A CYP aktiválás az enzimfehérje működésében bekövetkező változások kevésbé gyakori formája, amely során az enzimaktivitás szempontjából előnyösebb állapot alakul ki az aktiváló vegyület hatására, mint például a kinidin vagy a hidroxikinidin hatására bekövetkező CYP3A4 aktivitás növekedés, amely fokozza a meloxicam és piroxicam metabolizmusát (Ludwig 1999). A CYP enzimaktivitás gátlása, amely sokkal gyakoribb, lehet reverzibilis (kompetitív, nem-kompetitív, kevert-típusú, stb.) (pl. kompetitív CYP1A2 gátló: duloxetin, nem-kompetitív CYP2C19 gátló: fluvoxamin, kevert-típusú CYP3A4 gátló: ketokonazol) és irreverzibilis (pl. CYP2D6 gátló: paroxetin, CYP3A4 gátló: klaritromicin) (Benedetti 1998; Deodhar 2020). Reverzibilis gátlás esetén klinikailag szignifikáns interakcióra akkor számíthatunk, ha a gátlási állandó ( $K_i$ ) kisebb vagy hasonló, mint a terápiás dózisban alkalmazott CYP-gátló hatóanyag maximális vérszintje (Bjornsson 2003). Másrészt a gátlásból fakadóan komoly kölcsönhatás a fokozottan vagy mérsékelten érzékeny szubsztrátok esetén következik be, amelyek metabolizmusában kizárólagos vagy meghatározó szerepet játszik a gátolt CYP enzim (Tihanyi 2010; Hakkola 2020). Szigorú megítélés alá esik az ún. mechanizmus-alapú gátlás, hiszen az anyavegyületből olyan reaktív metabolit képződik, amely stabil enzim-intermedier komplexet képez és irreverzibilisen gátolja a CYP enzim működését (Deodhar 2020). A reverzibilis gátlás során a gátló hatás addig áll fenn, amíg a gátlószer jelen van az enzim környezetében, míg a mechanizmus-alapú gátlás alól nem szabadul fel az enzim, tehát hosszan tartó hatást eredményez és új enzim-fehérje szintézisre van szükség az újbóli működéshez. A CYP enzim gátlás következtében az adott CYP-szubsztrátok metabolizmusa csökken, magas vérszintek alakulhatnak ki, amely nem-kívánt hatásokhoz vezethet. Míg a CYP gátlás azonnali hatást eredményez az enzim működésében, addig a CYP indukció hosszabban alakul ki és lecsengése is tovább tart.

### **1.6 A CYP enzimek a gyógyszerbiztonsági vizsgálatokban és a klinikai alkalmazás során**

A várható farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások feltérképezése jelentősen csökkentheti a nem-kívánt mellékhatások miatt, a forgalomba hozatal után bekövetkező visszavonás kockázatát. Míg egy 2004-ben megjelent tanulmány szerint, az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (US Food and Drug Administration, FDA) által biztonsági okok miatt a forgalomból visszahívott gyógyszerek több mint felénél gyógyszer-interakció szerepelt az indoklásban (Huang SM 2004), addig Pelkonen és munkatársai (2020) által összegyűjtött adatok alapján, a 2007 után törzskönyvezett kis-molekulatömegű hatóanyagok között ugyan található CYP szubsztrátok, gátlószerek és induktor hatású vegyületek, egyetlen egyet sem kellett visszavonni CYP-kölcsönhatásra visszavezethető mellékhatások miatt.

### 1.6.1 A gyógyszerjelölt polimorf farmakokinetikai viselkedésének feltérképezése a gyógyszerfejlesztés során

A modern gyógyszerfejlesztés részét képezi a gyógyszerjelölttel kapcsolatban felmerülő olyan kérdések tisztázása, mint hogy 1) a metabolizmusában mely Fázis I vagy Fázis II enzimek vesznek részt, 2) a gyógyszerjelölt lehet-e forrása metabolikus gyógyszer-kölcsönhatásoknak, például gátolja-e valamelyik CYP enzim működését, vagy indukálja-e valamely CYP enzim transzkripcióját. Számos *in vitro* módszer létezik a fenti kérdések megválaszolására (Hewitt 2007; Tihanyi 2010; Fowler 2017; Tornio 2019; Lu 2020; Mann 2021), az alábbiakban azok ismertetésére térek ki, amelyeket a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportban meghonosítottunk és alkalmazunk a fejlesztés alatt álló hatóanyagok vizsgálatára.

A preklinikai *in vitro* és *in vivo* farmakokinetikai vizsgálatok választ adnak arra a kérdésre, hogy a gyógyszerjelölt eliminációjához milyen mértékben járul hozzá a hatóanyag metabolizmusa. Következő lépésként lényeges a gyógyszerjelölt metabolizmusát katalizáló enzim(ek) azonosítása. Az úgy nevezett „enzim-térképezés” egy logikusan felépített, *in vitro* vizsgálat-sorozatot takar, amelynek során humán májpreparátumon (pl. máj mikroszóma és citoszol frakció, primer hepatocita) végzett vizsgálatokban azonosíthatók be az egyes metabolikus lépésekért felelős enzim(ek) (Hewitt 2007; Knights 2016; Doerksen 2021). Az egyes metabolitok képződéséért felelős CYP izoenzimek azonosítása leggyakrabban humán máj mikroszómával CYP izoenzimszelektív gátlószerek (2. táblázat), esetleg ellenanyagok jelenlétében végzett vizsgálatokban történik, míg a rekombináns humán CYP enzimeket inkább a megerősítő vizsgálatokban alkalmazzák (Kremers 2002; Bjornsson 2003; Zhang 2007; Mann 2021). Az eredmények egyben arra is választ adnak, hogy egy vagy több enzim felelős-e az adott hatóanyag metabolizmusáért, illetve hogy az azonosított enzim(ek) genetikai polimorfizmusa, esetleg más hatóanyagok által kiváltott enzim gátlás vagy indukció okozhat-e számottevő inter-individuális különbségeket a hatóanyag „clearance”-ében (kiürülésében) a betegeknél történő klinikai alkalmazás során. Fejlesztési szempontból természetesen az az előnyös, ha egy gyógyszerjelölt metabolizmusát több enzim katalizálja, így a genetikai polimorfizmus és/vagy a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások érdemben kevésbé befolyásolják a hatóanyag metabolizmusát. A fejlesztés során lényeges annak értékelése is, hogy a gyógyszerjelölt maga lehet-e forrása farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatásoknak. A gyógyszerjelölt CYP enzim-gátló képességét humán máj mikroszóma preparátumon CYP-szelektív szubsztrátok bevonásával állapítják meg. A gátlás mértéke és típusa, valamint a terápiás dózisban alkalmazott hatóanyag vérkoncentrációja alapján becsülhető a gyógyszer-interakció valószínűsége a klinikai alkalmazás során. A gyógyszerjelöltek CYP-indukáló képességét korábban laboratóriumi állatokon tesztelték, ma már inkább primer hepatocitákon végzett vizsgálatokban állapítják meg. A primer hepatocitákat a gyógyszerjelölt

több koncentrációjával kezelve vizsgálják a CYP mRNS, az enzim-fehérje szint és a CYP enzimaktivitás változását, majd a változásokat ismert CYP induktor vegyülettel (2. táblázat) kezelt sejtek CYP expresszió és aktivitás változásához viszonyítva értékelik (Li 1997; Kremers 2002; Hewitt 2007; Lu 2020).

Egy gyógyszerjelölt fejlesztési fázisában elengedhetetlen a klinikai alkalmazás során várható inter-individuális farmakokinetikai különbségek feltárása, amelyek egyrészt a gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek genetikai polimorfizmusaira, másrészt a gyógyszerjelölt farmakokinetikai gyógyszer-interakcióira vezethetők vissza. A korai fejlesztési fázisban elvégzett vizsgálatok alapján a hatóanyag szerkezeti módosításaival esetlegesen korrigálható (méréselhető vagy kiküszöbölhető) a polimorf metabolizmus, illetve az enzim-gátló és/vagy indukáló képesség a farmakológiai hatás megtartása mellett. Így csökkenthető a forgalomba hozatal után történő visszahívás kockázata, legalábbis a farmakokinetikai gyógyszer-interakciókkal magyarázható visszavonás kockázata.

#### 1.6.2 Farmakokinetikai polimorfizmus a klinikai gyakorlatban

A gyógyszeres terápia során jelentkező nem-kívánt mellékhatások, vagy a főhatás elmaradása részben a gyógyszer-metabolizmus eltéréseiből vagy megváltozásából fakadhatnak. Az inter-individuális eltérések hátterében elsősorban a gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek, különösen a CYP enzimek genetikai polimorfizmusa áll (Sim 2011; Zhou 2015; Magro 2021). Az enzimaktivitás és/vagy expresszió változáshoz vezető variánsok miatt a beteg gyógyszer-lebontó képessége gyengébb (vagy fokozottabb) lehet a populáció többi tagjához viszonyítva (Zanger 2013). A gyenge gyógyszer-lebontó képességű egyén teljes értékű életet él mindaddig, míg egy olyan gyógyszerrel nem kezelik, amelynek metabolizmusában elsődlegesen az adott csökkent működőképességű enzim vesz részt. Ez esetben erősen redukált dózist, vagy más alternatív hatóanyagú készítményt célszerű alkalmazni. A különböző allélvariánsok azonosítására számtalan metodikai lehetőség létezik (pl. polimeráz-lánc-reakció [PCR] alapú és „microarray” technikák, restriktions fragmens-hossz polimorfizmus vizsgálat, PCR+Sanger szekvenálás, új-generációs-szekvenálás [NGS] alapú módszerek) (Mroz 2021). Az első, rutin vizsgálatokra alkalmas CYP genotípus teszt az FDA által is elfogadott AmpliChip CYP450 GeneChip® (Roche Molecular Systems és Affimetrix) volt, amely számos CYP2D6 és CYP2C19 allél azonosítására alkalmas (Jain 2005). Az elmúlt évtizedben a farmakogenetikai tesztek és szolgáltatások száma világszerte megszorodott, azonban fontos szem előtt tartani az egyes módszerek lehetőségeit és hátrányait ahhoz, hogy az adott klinikai vizsgálathoz megfelelőt kiválasszuk. A genotípus alapján becsült fenotípus képezi az alapját a gyógyszer-hatóságok (FDA, EMA - European Medicines Agency) és a farmakogenetikai munkacsoportok által kialakított ajánlásoknak (pl.

<https://epicpgx.org/guidelines/>) egyes hatóanyagok farmakogenetikai alapú alkalmazására (van der Wouden 2017; Swen 2018; Shekhani 2020). A farmakogenetikai vizsgálatok azonban csak a genetikai polimorfizmusból fakadó enzimaktivitás variabilitás feltérképezésére irányulnak, nem adnak információt a nem-genetikai tényezők hatásairól és a betegek aktuális gyógyszer-lebontó képességéről. A személyre szabott gyógyszeres terápiák kialakításához szükség van olyan megoldásokra és módszerekre, amelyek a genetikai variánsok azonosítása mellett megbízhatóan jelzik a beteg gyógyszer-metabolizáló képességét az adott időpontban.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezés alapját képező kutatómunka célja a gyógyszerek lebontásában, enzimatis, főként CYP enzimekhez köthető átalakításában mutatkozó egyéni különbségek és a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatásokra visszavezethető eltérések tanulmányozása volt, amelynek eredményei hozzájárulhatnak a biztonságos gyógyszerhasználat megteremtéséhez. Három egymásra épülő kérdéskörre fókuszáltam.

1. Mivel a gyógyszerbiztonság megteremtése már a gyógyszerfejlesztés során elkezdődik, célul tűztem ki a gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének, metabolizmusának és gyógyszer-interakciós sajátosságainak meghatározására alkalmas *in vitro* módszerek meghonosítását, a vizsgálatokhoz szükséges májmodellek beállítását és finomítását, valamint alkalmazását fejlesztés alatt álló gyógyszerjelöltek és klinikai használatban lévő gyógyszerek jellemzésére.
2. A biztonságos gyógyszerhasználat alapjaihoz tartozik a gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek működését befolyásoló tényezők megismerése, ezért központi szerepet kapott a CYP enzimek aktivitására érdemben kiható genetikai polimorfizmusok és a fenokonverziót eredményező faktorok azonosítása is.
3. Végül a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének valós idejű jellemzésére helyeztem a hangsúlyt. Egy olyan diagnosztikai eljárás kidolgozását céloztam meg és a klinikai gyakorlatban való használhatóságát igyekeztem igazolni, amely fontos eszköze lehet a személyre szabott gyógyszeres kezeléseknak és az elvárásoknak megfelelő gyógyszerbiztonság megteremtésének.

### 3 ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

#### 3.1 Gyógyszerjelöltek és gyógyszer-hatóanyagok

A panomifen [E-1,2-difenil-1-[4-(2-(2-hidroxietyl-amino)-etoxi)-fenil]-3,3,3-trifluorpropén] és a deramciklan [(1R,2S,4R)-(-)-2-fenil-2-(2'-dimetilamino-etoxi)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptán] az EGIS Gyógyszergyár ZRt (Budapest), a GYKI-47261 [6-(4-amino-fenil)-8-klór-2-metil-11H-imidazo[1,2c][2,3]benzodiazepin az IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft (Budapest), a LK-935 [2-((3,4-diklórfenil)(propil)amino)-1-(piridin-3-il)etanol] és a LK-980 [2-(4-fenilpiperazin-1-il)-1-(piridin-3-il)etanol] a Lek Pharmaceuticals d.d. (Ljubljana, Szlovénia) által fejlesztett gyógyszerjelöltek voltak. A forgalomban lévő pszichofarmakonok (aripiprazol, biperiden, citalopram, karbamazepin, klonazepam, klozapin, duloxetin, fluoxetin, haloperidol, mianserin, mirtazapin, olanzapin, paroxetin, kvetiapin, risperidon, venlafaxin), koleszterinszintcsökkentők (atorvasztatin, rosuvasztatin), a paracetamol, a monensin és a tiamulin a Merck (Darmstadt, Németország; Sigma-Aldrich Co., Deisenhofen, Németország), az International Laboratory USA (San Francisco, CA), a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Németország), a Roche Magyarország (Budaörs) és a Richter Gedeon NyRt (Budapest) termékei voltak.

#### 3.2 Humán minták

A humán májszövet minták a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikájáról, míg a vérminták a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikájáról, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájáról, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikájáról, valamint a Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézet Madarász utcai Gyermekkorházától származtak. A humán mintákon végzett vizsgálatokhoz beszereztük az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásügyi Bizottságának, valamint a Semmelweis Egyetem Regionális Tudományos és Kutatásügyi Bizottságának engedélyeit.

#### 3.3 Az *in vitro* vizsgálatokban alkalmazott májpreparátumok

Az *in vitro* farmakokinetikai, metabolizmus és gyógyszer-interakciós vizsgálatokhoz májszövetből izolált primer májsejteket és mikroszóma frakciót használtunk. A primer hepatocitákban intakt állapotban megtalálható az összes gyógyszer-metabolizáló enzim és a működésükhöz szükséges kofaktorok, míg a mikroszóma frakció csak az endoplazmás retikulum membránjához kötött enzimeket tartalmazza, a kofaktorokat azonban nem. A mikroszóma frakció lehetőséget biztosít arra, hogy az enzimek működéséhez szükséges kofaktorok (pl. NADPH, UDP-glukuronsav, glutation) hozzáadásával következtessünk a főbb metabolikus útvonalak szerepére.

A primer hepatocitákat hím Wistar patkányból, hím NMRI egérből, hím Beagle kutyából, vagy hím New-Zealand nyúlból (Toxi-Coop ZRt., Budapest) és humán májszövetből kollagenáz-perfúziós módszerrel izoláltuk (Bayliss 1996). A májszövetet a májkapu vénán (v. portae) keresztül perfundáltuk, a sejtek közötti dezmoszómális kapcsolatot a  $\text{Ca}^{2+}$  megkötésével (EGTA-tartalmú perfúziós oldat: Earl's balanced salt solution, pH 7,4, 37°C) megszüntettük, majd EGTA-mentes perfúziós oldattal átmostuk, végül kollagenáz és  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú oldattal izoláltuk a májsejteket. A vizsgálatokhoz 90%-nál magasabb életképességű sejteket (trypan kék kizárás alapján) használtunk (Berry 1991). A máj mikroszóma preparátumot differenciál centrifugálással (10.000×g 30 perc, 105.000×g 60 perc) nyertük van der Hoeven és Coon (1974) módszere alapján, a preparátumok fehérje-tartalmát Lowry és munkatársai (1951) által leírt módszer szerint mértük marha szérum albumint használva standardként.

### 3.4 *In vitro* farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatok

A hatóanyagok eltűnési kinetikáját májsejt szuszpenzióban határoztuk meg, a hatóanyagokat (pszichofarmakonok, LK-935, LK-980) közvetlenül a médiumhoz adtuk (Williams' medium E: Ham's F12=1:1) általában 1  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban úgy, hogy a vivőszer koncentrációja ne haladja meg a 0,1%-ot. Az inkubálás során több időpontban mintát vettünk és a hatóanyag koncentrációt a mintákban LC-MS/MS (folyadékkromatográfia-tömegspektrometria) technikával határoztuk meg. Az LC-MS/MS méréseket Szabó Pál (MTA Kémiai Kutatóközpont) és Sirok Dávid (Természettudományi Kutatóközpont, Toxi-Coop ZRt) végezte. A hatóanyag koncentráció csökkenéséből kalkuláltuk az *in vitro* farmakokinetikai paramétereket (felezési idő,  $t_{1/2}$ ; „intrinsic clearance”,  $Cl_{int}$ ), amelyből becsültük az *in vivo* máj „clearance” ( $Cl_H$ ) értéket, a máj extrakciós határfokát ( $E$ ) és a biohasznosulást ( $F$ ) (Függelék 12.2).

A fejlesztés alatt álló gyógyszerjelöltek (LK-935, panomifen) *in vitro* metabolizmus vizsgálatát primer hepatocitákon, illetve máj mikroszómán végeztük. A metabolitok tömegspektrometriás szerkezet-azonosítása Szabó Pál és Czira Gábor (MTA Kémiai Kutatóközpont) közreműködésével történt.

### 3.5 Farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatás vizsgálatok

#### 3.5.1 Enzim-térképezés

A hatóanyagok, enzim-szubsztrátok átalakítását és az egyes metabolikus lépéseket katalizáló enzimek azonosítása 1) elsősorban máj mikroszóma preparátumon CYP-szelektív kémiai gátlószerekkel (2. táblázat), 2) cDNS expresszált egyedi CYP enzimek bevonásával, 3) vagy humán máj mikroszóma panel CYP-marker aktivitásaival való összehasonlítással történt.



1) A mikroszómális inkubálások során a NADPH hozzáadásával képződő metabolitok monooxygenáz enzim (CYP vagy flavin monooxygenáz enzimek) reakciót jelentenek, míg a mikroszóma preparátum 45°C-os hőkezelése után is képződő metabolitok a CYP enzimek működésének köszönhetőek. Az egyes CYP enzimek azonosítása CYP-szelektív gátlószer jelenlétében a gátlószer-mentes inkubálás során való metabolit termelődéshez viszonyítva, míg a gátlás mértékének ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ) megállapítása különböző koncentrációban alkalmazott hatóanyag/szubsztrát és CYP-szelektív gátlószer mellett történt. Az LK-935 metabolitok képződéséért felelős enzimek azonosítása után a gátlás  $K_i$  értékeit is meghatároztuk. A deramciklan metabolikus lépéseit elsősorban katalizáló CYP2E1 szerepét izoniaziddal kezelt (50 mg/kg) és kezeletlen patkányok májából izolált mikroszómával való inkubálás során is teszteltük. A *p*-nitrofenol hidroxilezésében, valamint a 7-hidroxi-4-trifluorometil-kumarin *O*-demetilezésében részt vevő enzimek tesztelése után az érdemi gátolhatóságot mutató enzimeknél meghatároztuk a  $K_i$  értékeket is. A vizsgálatok módszertani részletei publikált munkákban megtalálhatók (**D2**, **D5-7**).

2) A cDNS expresszált egyedi CYP enzimeket tartalmazó mikroszóma preparátumok (Supersomes) az adott CYP enzimen kívül a NADPH-citokrom P450-reduktázt is tartalmazták; a CYP enzimek megfelelő működéséhez pedig a reakció elegyet kiegészítettük NADPH-val. cDNS expresszált CYP2E1 enzim alkalmazásával megerősítettük a CYP-szelektív gátlószerekkel végzett máj mikroszómális deramciklan enzim-térképezés eredményeit. Továbbá cDNS expresszált humán CYP panelt (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4) használtunk a 7-hidroxi-4-trifluorometil-kumarin *O*-demetilezésében részt vevő enzimek azonosítására (részletek a **D5** és **D7** publikációkban találhatóak).

3) A CYP enzimek szerepének tisztázására a 7-hidroxi-4-trifluorometil-kumarin *O*-demetilezésében, valamint a paracetamol reaktív metabolitjának képződésében egy további megközelítést, - a kérdéses reakció és a klasszikus CYP-marker aktivitások (1. táblázat) összehasonlítását humán mikroszóma panelen - is alkalmaztunk (részletek a **D7** és **D8** publikációban).

### 3.5.2 CYP enzim gátlás

Az előzetes szűrés során a gyógyszerjelöltet egy koncentrációban alkalmazva vizsgáltuk a CYP-specifikus reakciókban (1. táblázat) bekövetkező aktivitás változást, majd a gátolt CYP reakciót részletesebben (több gyógyszerjelölt koncentráció és/vagy több CYP-szelektív szubsztrát koncentráció mellett) is teszteltük, amely alapján meghatározhatók a gátlást jellemző  $IC_{50}$  vagy  $K_i$  értékek (Bjornsson 2003; Parkinson 2010; Tihanyi 2010; Lu 2020).

A gyógyszerjelölt deramciklan, valamint a fő metabolit *N*-dezmethyl deramciklan CYP2E1-gátló sajátságát a CYP2E1-szelektív klórozoxazon 6-hidroxiáz aktivitás alapján teszteltük (Peter 1990). A közvetlen gátlás vizsgálatakor a klórozoxazont és a deramciklant, vagy metabolitját egyszerre adtuk a máj mikroszómához, míg a metabolizmus következményeként kialakuló gátlás tesztelése során az anyavegyülettel, illetve *N*-dezmethyl metabolitjával előinkubálást végeztünk (15, 30 vagy 60 percig), majd ezután adtuk a reakció elegyhez a CYP2E1 próba-szubsztrát klórozoxazont. A gátlási állandó ( $K_i$ ) meghatározásához a deramciklant különböző koncentrációkban (0,1–200  $\mu\text{M}$ ) 30 percig előinkubáltuk, majd a klórozoxazont is különböző koncentrációkban (2–200  $\mu\text{M}$ ) adtuk az inkubációs elegyhez. A deramciklan koncentráció – CYP2E1 aktivitás reciproka összefüggés alapján határoztuk meg a  $K_i$  értéket (Dixon-féle meghatározás).

A paracetamolból képződő reaktív *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin (NAPQI) detektálása glutation konjugátum formájában történt, ezért az inkubációs elegy a humán máj mikroszóma és a NADPH mellett redukált glutationt is tartalmazott (S24). Tíz CYP2E1 gátlónak tartott vegyületet (cimetidin, klórpromazin, diklofenak, flufenazin, tioridazin, izoniazid, diallil-szulfid, 4-metilpirazol, diszulfiram, dietil-ditiokarbamát) teszteltünk, hogy milyen mértékben képesek a paracetamol > NAPQI átalakulást gátolni, majd a hatékony gátlást mutató vegyületeket különböző koncentrációban alkalmazva meghatároztuk az  $\text{IC}_{50}$  értékeket is (részletek a D8 publikációban).

Az állatorvosi gyakorlatban a tiamulin és monensin együttes alkalmazása során fellépő toxicitás magyarázatául megvizsgáltuk a tiamulin CYP-interakciós sajátságait és a monensin metabolizmusára gyakorolt hatását a következő lépésekben: 1) patkány máj mikroszómában azonosítottuk a monensin metabolizmusában szerepet játszó CYP enzimeket (enzim-térképezés); 2) patkányoknál meghatároztuk az *in vivo* tiamulin kezelés (40 és 200 mg/kg) okozta CYP3A1 enzimfehérje expresszió- és CYP3A aktivitás-változásokat (etilmorfín és aminopiridin *N*-demetiláz), beleértve a monensin *O*-demetiláz aktivitást is, valamint összehasonlítottuk a tiamulin hatását a fenobarbitállal, dexametazonnal, troleandomicinnel kiváltott indukcióval; 3) patkány máj mikroszómában megállapítottuk a tiamulin CYP3A aktivitást és monensin *O*-demetiláz gátló hatását; 4) patkány máj mikroszómában összehasonlítottuk a tiamulin és a troleandomicin metabolikus intermedierek komplex képződését (részletek a D10 publikációban).

### 3.5.3 CYP enzim indukció

A hatóanyagok CYP-indukáló képességét primer hepatocitákból kialakított „egy-sejt-réteg” kultúrában teszteltük. Az indukciót CYP mRNS expresszió (kvantitatív PCR), CYP fehérje expresszió („Immunoblot” analízis) és CYP-szelektív aktivitás (CYP2B6: *S*-mefenitoin *N*-demetiláz; CYP2C9: tolbutamid 4-hidroxiáz; CYP2C19: *S*-mefenitoin 4'-hidroxiáz; CYP3A4: nifedipin oxidáz; CYP2E1: klórozoxazon 6-hidroxiáz és 7-etoxikumarin *O*-dealkiláz) alapján

határoztuk meg a kontroll sejtekhez (vivőszerrel kezelt sejtek) viszonyítva. A gyógyszerjelölt hatóanyagok által kiváltott indukció mértékét ismert CYP induktorokhoz hasonlítottuk. A koleszterinszint-csökkentő hatóanyagok (LK-935, atorvasztatin, rosuvasztatin) CYP-indukáló képességét a rifampicinhez, míg az AMPA antagonistá GYKI-47261 indukáló képességét az imidazolhoz hasonlítottuk. Részletek a **D2** és **D9** publikációkban találhatók.

A koleszterinszint-csökkentők által kiváltott CYP3A4 indukció mechanizmusának feltárását, humán PXR és CAR nukleáris receptor aktiváló képességét HepG2 sejtekben (humán hepatocelluláris karcinoma sejtvonala) teszteltük. A sejteket hPXR-al, illetve hCAR-al transzfektáltuk, riporterként luciferázzal kapcsolt CYP3A4 promótert (pGL3(CYP3A4/XREM[-7800/-7200]/-263/+11)LUC) használtunk. A HepG2 vizsgálatokat Jean-Marc Pascussi (INSERM, Montpellier, Franciaország) végezte.

### 3.6 CYP enzimaktivitás meghatározás

A CYP-szelektív aktivitásokat (CYP1A: 7-etoxiresorufin *O*-deetiláz; CYP1A2: fenacetin *O*-dealkiláz; CYP2B6: *S*-mefenitoin *N*-demetiláz; CYP2C9: tolbutamid 4-hidroxiláz; CYP2C19: *S*-mefenitoin 4'-hidroxiláz; CYP2D6: dextrometofan *O*-demetiláz; CYP2E1: klórozoxazon 6-hidroxiláz és 7-etoxikumarin *O*-dealkiláz; CYP3A4: nifedipin oxidáz, midazolam 1'- és 4-hidroxiláz) máj mikroszómában vagy primer hepatocitákban határoztuk meg publikált módszerek alapján (Monostory 1996; Butler 1989; Heyn 1996; Miners 1996; Srivastava 1991; Kronbach 1987 és 1989; Peter 1990; Guengerich 1986).

### 3.7 Genetikai polimorfizmusok és CYP mRNS expresszió meghatározása

Humán májszövet és vérmintákból genomiális DNS-t izoláltunk Quick DNA<sup>TM</sup> Universal Kit-tel (Zymo Research Irvine CA) és hidrolízis SNP analízist végeztünk a Függelék 12.1 táblázatában bemutatott CYP SNP-k, illetve NAT2 SNP-k azonosítására. A PCR alapú vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható vagy saját tervezésű primereket és TaqMan próbákat használtunk (részletek a **D11**, **D12**, **D14-16**, **D20**, **D29** publikációkban). A *CYP2B6* 18053A>G (rs2279343) SNP, valamint a *CYP2D6* multiplikáció allél-specifikus meghatározása speciális módszerfejlesztést igényelt (részletek a **D12**, **D16** publikációkban).

A májszövet mintákból, illetve a primer hepatocitákból, valamint a vérmintákból vörösvértest lízissel izolált fehérvérsejtekből TRIzol reagens extrakcióval kinyertük az RNS-t. A reverz transzkripcióval szintetizált cDNS-el végzett valós idejű PCR vizsgálat során határoztuk meg a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, illetve CYP3A4, valamint az ösztrogén receptor  $\alpha$  és androgén receptor expressziót (részletek a **D11**, **D12**, **D14**, **D18-21** publikációkban). A **D9** publikációban szereplő CYP2E1 mRNS expresszió és a **D17**

publikációban szereplő CYP1A1 expresszió meghatározása „Northern blot” analízissel történt Magnus Ingelman-Sundberg (Karolinska Institute, Stockholm, Svédország) és Russell A. Prough (University of Louisville, Louisville KY) laboratóriumában.

### 3.8 CYP fehérje expresszió meghatározása („Immunoblot” analízis)

A sejt kultúra vizsgálatokban hepatocitákból izolált mikroszóma frakcióban határoztuk meg a CYP1A1 (patkány, humán), CYP2E1 (patkány, humán), CYP3A1 (patkány), vagy CYP3A4 (humán) fehérje expressziót (részletek a **D2**, **D9**, **D10**, **D17** publikációkban).

### 3.9 A dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP-indukáló hatásának meghatározása

A vizsgálatokat patkány, egér (vad-típusú CAR+/+ és CAR-hiányos CAR-/-) és humán primer májsejteken, „egy-sejt-réteg” kultúrában végeztük. A hepatocitákat a kollagén felszínhez való letapadás után a szérum-mentes médiumhoz adott hatóanyagokkal (3-metilkolantrén, dexametazon, dehidroepiandroszteron, 7 $\alpha$ -hidroxi-dehidroepiandroszteron, 7-oxo-dehidroepiandroszteron, RU-486: mifepriszton, ICI-164,384, bikalutamid, TCPOBOP: 1,4-Bis[2-(3,5-diklóripiridiloxi)]benzén, androsztanol, CITCO: 6-(4-klórphenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-karbaldehid O-(3,4-diklórbenzil)oxim) kezeltük a **D17-19** publikációkban leírtak szerint.

Kiegészítő vizsgálatokat végeztünk MCF-7 (humán emlő daganat) és LNCaP (humán prosztata daganat) sejtvonalakban a CYP1A2 indukció kialakulásának és a transzkripció aktinomicin D-vel történő leállítás után a CYP1A2 mRNS degradációjának meghatározására. A CYP1A2 indukció és az mRNS degradáció kinetikájának matematikai modelljét a kísérletes eredmények alapján Ales Belic (University of Ljubljana, Ljubljana, Szlovénia) készítette (részletek a **D18** publikációban).

A humán PXR aktiválást HuH7 (humán máj daganat) sejtvonalban vizsgáltuk, a sejteket pSG5 vagy pSG5-hPXR plazmiddal, pGL3(CYP3A4/XREM[-7800/-7200]/-262/+11)LUC riportter plazmiddal és pSV- $\beta$ -galaktozidáz referencia plazmiddal transzfektáltuk. A sejteket dehidroepiandroszteronnal vagy SR-12813-al kezeltük és meghatároztuk a luciferáz, illetve a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásokat (részletek a **D19** publikációban). A vizsgálatokat Jean-Marc Pascussi (INSERM U632, Montpellier, Franciaország) végezte.

A sejtmagba történő CAR transzlokáció vizsgálatát pEGFP-c1-hCAR plazmiddal transzfektált egér primer májsejteken végeztük. A sejteket dehidroepiandroszteronnal vagy a referencia CITCO-val kezeltük. Fixálás után a GFP-CAR fúziós fehérjét és a DAPI-val festett sejtmagot fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (részletek a **D19** publikációban). A vizsgálatokat Tamási Viola végezte Urs A. Meyer laboratóriumában (University of Basel, Basel, Svájc).

### **3.10 Gyógyszer-hatóanyagok vérszintjének meghatározása**

A ciklosporin és takrolimusz vérkoncentrációjának meghatározása immunesszé technikával történt (Cyclosporine Flex on Dimension RxL HM, Dade Behring Ltd, Milton Keynes UK; TACR Flex Dimension, Dade Behring Inc, Newark DE), a méréseket Sárváry Enikő (Semmelweis Egyetem, Budapest) végezte. A valproát vérszintek szintén immunesszé technikával kerültek meghatározásra (AxSYM Valproic Acid Assay, Abbott Laboratories, IL) a Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézetben és a Semmelweis Egyetemen. Az aripiprazol, klozapin és klonazepam, valamint metabolitjaik (dehidroaripiprazol, hidrox-aripiprazol, klozapin *N*-oxid, norklozapin, 7-amino-klonazepam) vérszint meghatározása LC-MS/MS módszerrel történt, a méréseket Sirok Dávid (Természettudományi Kutatóközpont, Toxi-Coop ZRt) végezte. (Részletek a **D22**, **D25**, **D27-29** publikációkban.)

### **3.11 A májszövet donorok és a betegek demográfiai és klinikai adatai**

A májszövet donorok és a vizsgálatokba bevont betegek demográfiai és klinikai adatait (életkor, nem, testtömeg, megbetegedések), a gyógyszeres kezelésre (hatóanyag, napi dózis), dohányzási és alkoholfogyasztási szokásokra, valamint a mellékhatásokra vonatkozó információkat a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikáján, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikáján, valamint a Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézet, Madarász utcai Gyermekkorházában gyűjtöttük.

### **3.12 Statisztikai analízis**

A *CYP1A2* és *CYP2B6* haplotípusok azonosításához a PHASE szoftvert (v2.1; Department of Statistics, University of Washington, Seattle WA), az adatok statisztikai értékelésénél a GraphPad Instat szoftvert (v3.05, GraphPad Software, San Diego CA), a multivariancia analízishez pedig az IBM SPSS Statistics szoftvert [v28.0.1.0 (142), IBM Corp., Armonk NY] használtuk. Az aripiprazol, a klozapin és a klonazepam vérszint kialakulásában meghatározó szerepet játszó faktorok azonosítását főkomponens analízissel végeztük, a meghatározó faktorok és a vérszintek közötti összefüggéseket PLS (részleges legkisebb négyzetek) regressziós modell alapján állapítottuk meg; az analíziseket Ales Belic (University of Ljubljana, Ljubljana, Szlovénia) végezte (részletek a **D27-29** publikációkban).

## 4 EREDMÉNYEK

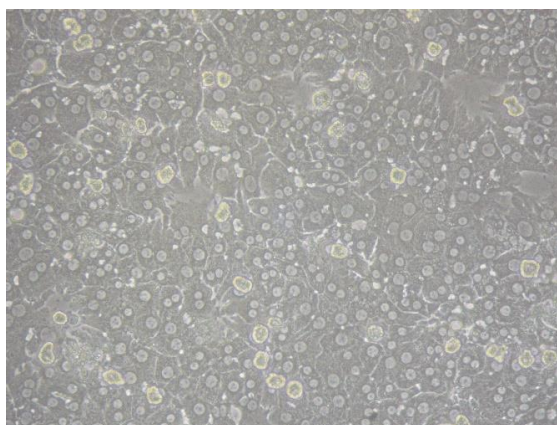
A gyógyszerfejlesztés korai fázisában érdemes 1) feltárni az ember és a laboratóriumi állatok között lévő farmakokinetikai különbségeket, amely elősegítheti a biztonsági vizsgálatok tervezését és eredményeinek értékelését, 2) valamint előzetesen feltérképezni a várható polimorf metabolizmust és a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatásokat, amely csökkentheti a hatás elmaradásának, illetve a mellékhatások kialakulásának kockázatát a humán alkalmazás során. A betegeknél jelentkező farmakokinetikai eltérések okainak tisztázása és a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek működését befolyásoló tényezők azonosítása úgyszintén hozzájárulhat a biztonságosabb gyógyszerhasználat megteremtéséhez. A dolgozatban bemutatásra kerülő eredmények ennek megfelelően három területet érintenek: 1) a gyógyszerjelöltek és gyógyszer-hatóanyagok *in vitro* farmakokinetikai viselkedésének, metabolizmusának és gyógyszer-kölcsönhatás profiljának feltárását, 2) a gyógyszer-metabolizmust nagyban meghatározó CYP fenokonverzió értékelését, 3) és a betegek gyógyszer-metabolizáló képességéhez igazított gyógyszeres terápia lehetőségeit.

### 4.1 Gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedése, metabolizmusa és gyógyszer-interakciós sajátosságai

A felfedező kutatás során, illetve a preklinikai fázisban végzett *in silico* és *in vitro* vizsgálatok eredményei értékes információt jelentenek az *in vivo* farmakokinetikai és toxikológiai vizsgálatokhoz vagy a fejlesztés klinikai vizsgálataihoz, valamint megkönnyítik az állatról emberre történő extrapolációt (Kim 2018; Kazmi 2019). A gyógyszerjelöltek farmakokinetikai viselkedésének *in silico* becslése nem nélkülözheti az *in vitro* modelleken végzett kísérletes megerősítést, ugyanakkor nem szabad megfeledkezni arról, hogy az *in vitro* modellek sem reprezentálják a teljes fiziológiai környezetet. Az *in vitro* farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokat általában a toxikológiai vizsgálatokban használt laboratóriumi állatokból és humán májból izolált primer májsejteken vagy máj szubcelluláris preparátumokon (pl. mikroszóma, citoszol, S9 frakció), esetleg rekombináns enzimekkel végezzük (Chung 2015; Pantaleão 2022). A vizsgálatok lehetővé teszik 1) egyrészt a gyógyszerjelölt hatóanyag farmakokinetikai viselkedésének meghatározását és összehasonlítását a vegyület-család egyéb tagjaival vagy már ismert vegyülettel/vegyületekkel, 2) másrészt az egyes laboratóriumi állatfajokban és az emberben mutatkozó farmakokinetikai és metabolit-profil különbségek feltárását, 3) végül a képződő metabolitok szerkezetének meghatározását.

A MTA Kémiai Kutatóközpont, Farmakobiokémiai Osztályán (Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások kutatócsoportban) olyan *in vitro* módszereket honosítottunk meg és fejlesztettünk

tovább, amelyek primer hepatociták és máj mikroszóma frakció alkalmazásával lehetővé teszik a gyógyszerek *in vivo* várható metabolikus sajátságainak és farmakokinetikai gyógyszer-interakciós viselkedésének becslését. A primer májsejtek viszonylag egyszerűen kezelhető, *in vitro* modellként szolgálnak a farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokhoz, használhatók sejtszuspenzióban néhány órás inkubálás során, vagy kollagén felszínen „egy-sejt-réteg” („monolayer”) kultúrában (9. ábra) akár több napon keresztül. Ugyanakkor felmerülhet a kérdés, hogy az *in vivo* környezetből eltávolított és mesterséges körülmények közé helyezett májsejtek mennyiben tartják meg az intakt májra jellemző gyógyszer-metabolizáló képességet.



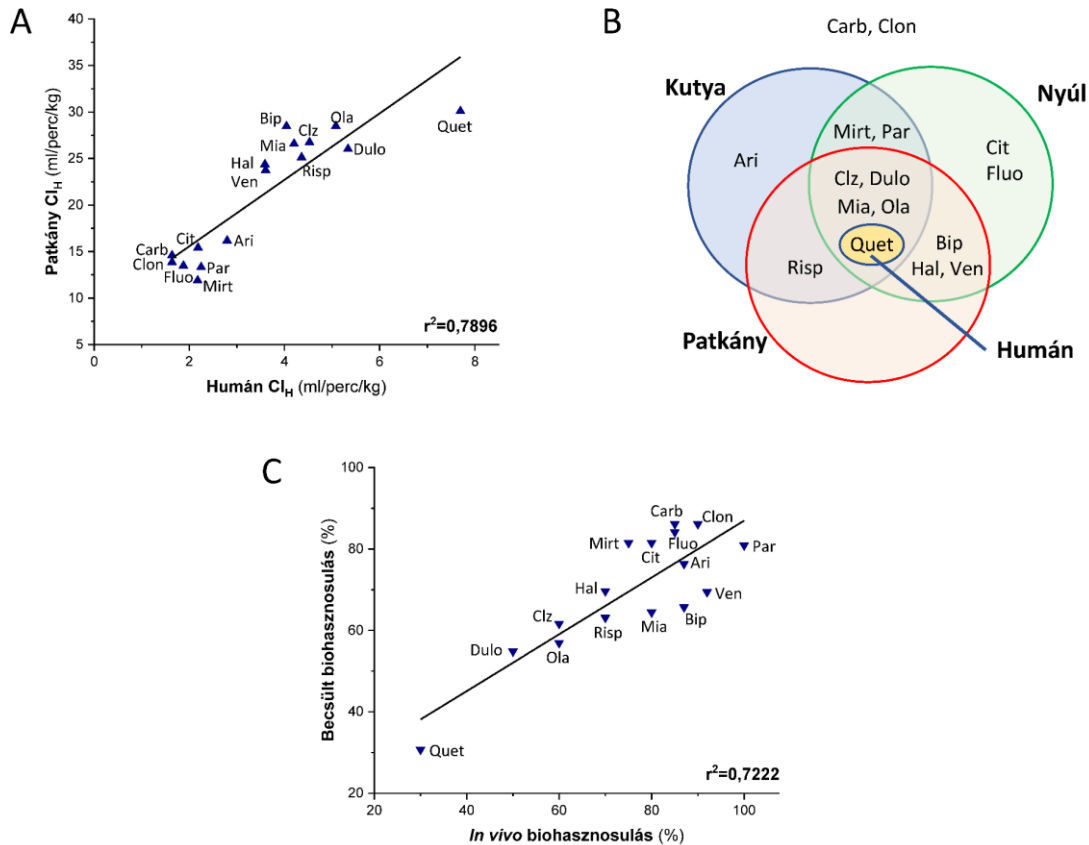
9. ábra: Primer hepatocita „egy-sejt-réteg” kultúra (Minus Annamária által készített fotó)

A szubcelluláris frakciók közül a máj mikroszóma preparátum korlátozottan szintén alkalmas modell lehet farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokban. A preparátum jellegéből fakad, hogy 1) csak az endoplazmás retikulum membránjához kapcsolható metabolizmust tükrözi, azaz a CYP enzimek, flavin-tartalmú monooxygenázok, UDP-glukuronil transzferázok és a glutation *S*-transzferázok egy része által katalizált gyógyszer-metabolizmusról nyerhető információ, 2) valamint hogy az enzimek működéséhez szükséges kofaktorokról gondoskodni kell az inkubálás során. A máj mikroszóma preparátumok nagy előnye, hogy fagyaszthatók és több éven keresztül tárolhatók  $-80^{\circ}\text{C}$ -on anélkül, hogy a Fázis I és Fázis II enzimek számottevően veszítenének metabolizáló képességükből.

#### 4.1.1 Primer májsejt modell alkalmazhatósága *in vivo* „clearance” becslésre (D1-3)

A primer hepatocita modell alkalmazhatóságát 16 forgalomban lévő pszichofarmakon (aripirazol, biperiden, citalopram, duloxetin, fluoxetin, haloperidol, karbamazepin, klonazepam, klozapin, kvetiapin, mianserin, mirtazapin, olanzapin, paroxetin, risperidon, venlafaxin) *in vitro* farmakokinetikai vizsgálatán keresztül szemléltetem (D1). A biztonsági vizsgálatokban használt laboratóriumi állatok (patkány, kutya, nyúl) májából és humán májszövetből izolált, szuszpenzióban tartott sejteken meghatároztuk a hatóanyagok *in vitro* farmakokinetikai

paramétereit ( $t_{1/2}$  felezési idő,  $Cl_{int}$  „intrinsic clearance”), amelyből becstültük az *in vivo* hepatikus „clearance”-t ( $Cl_H$ ), a máj extrakciós hatásfokát ( $E$ ) és a biohasznosulást ( $F$ ) (Függelék 12.2). A primer májsejtek alkalmazhatóságát a humán hepatocitákon nyert biohasznosulási adatok és az irodalomban fellelhető klinikai adatok összehasonlítása alapján állapítottuk meg (10. ábra).



10. ábra: Tizenhat pszichofarmakon primer hepatocitákon meghatározott farmakokinetikai viselkedése alapján becstült *in vivo* paraméterek: A) a máj „clearance” ( $Cl_H$ ) hasonlósága patkány és humán májsejtekből becstült adatok alapján; B) a máj extrakciós hatásfoka alapján patkányban, kutyaiban, nyúlban és emberben magas extrakciójának ( $E > 0,7$ ) minősített hatóanyagok; C) az *in vitro* farmakokinetikai paramétereiből becstült biohasznosulás ( $F$ ) összevetése a klinikai vizsgálatokból származó biohasznosulás adatokkal. Ari aripirazol, Bip biperiden, Carb karbamazepin, Cit citalopram, Clon klonazepam, Clz klozapin, Dulo duloxetin, Fluo fluoxetin, Hal haloperidol, Mia mianserin, Mirt mirtazapin, Ola olanzapin, Par paroxetin, Quet kvetiapin, Risp risperidon, Ven venlafaxin

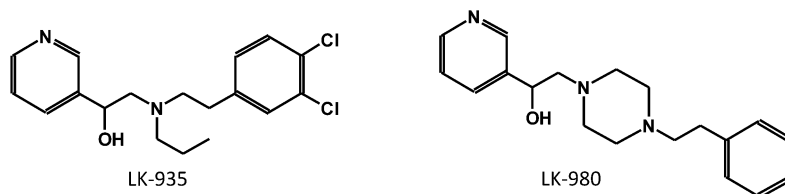
A primer hepatocitákon nyert *in vitro* farmakokinetikai paraméterek jelentős faji különbségeket jeleztek. A patkány és humán sejtek „intrinsic clearance” adatai alapján becstült hepatikus „clearance” értékek között nagyfokú hasonlóságot találtunk ( $r^2=0,7896$ ; 10.A ábra), azonban sem a kutya, sem a nyúl májsejteken kapott értékek nem emlékeztettek a humán sejteken nyert adatokra ( $r^2 \leq 0,2$ ). Mindez azt is sejteti, hogy a 16 pszichofarmakon esetén a patkány, mint laboratóriumi modell állat tekinthető relevánsnak az emberre, így a patkányon végzett biztonsági vizsgálatok



eredményeiből következtethetünk legjobban az emberben várható kinetikai viselkedésre. A preklinikai gyógyszerfejlesztés során arra van lehetőség, hogy laboratóriumi állatokon végzett vizsgálatok eredményeiből biztonsági faktorok beépítésével becsüljük a hatóanyag humán kipróbálás során várható viselkedését. Ahogy a **D1** publikációban bemutatott eredmények is érzékeltették, a hatóanyagok farmakokinetikai sajátásaiban jelentős különbségek becsülhetők a laboratóriumi állatokból és az emberből származó májsejteken, amely az eltérő gyógyszer-metabolizáló és elimináló képességre is visszavezethető. Ismert, hogy a nyúlban zajló gyógyszer-metabolizmusban a CYP2C enzimeknek van a legnagyobb szerepe (Zuber 2002), míg emberben a CYP3A enzimek katalizálják a legtöbb hatóanyag metabolizmusát (ld. 7. ábra). Ugyanakkor a nyúl CYP2D ortológ elhanyagolható részt vállal a gyógyszerek átalakításában, szemben a humán CYP2D6 enzimmel, ami alacsony májban mérhető koncentrációja ellenére a hatóanyagok kb. 20%-ának metabolizmusában vesz részt. A nyúl és az ember CYP metabolizmusának szignifikáns különbségei miatt a nyúl nem tekinthető ideális modellnek a farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatokban. Ugyanakkor a kutya CYP2D13 ortológ aktivitása sok szempontból hasonlít a humán CYP2D6-ra (Zuber 2002). A 16 pszichofarmakon közül számos hatóanyag (aripiprazol, citalopram, duloxetin, fluoxetin, haloperidol, mianserin, mirtazapin, olanzapin, paroxetin, quetiapin, risperidon, venlafaxin) metabolizmusát katalizálja a CYP2D6 (Hiemke 2011), a kutya és a humán májsejteken kapott „intrinsic clearance” értékek között mégsem találtunk korrelációt, ami magyarázható részben a CYP2D6 és CYP2D13 szubsztrát-specifitás eltéréseivel, de leginkább az embernél és a kutyánál leírt metabolikus útvonalak különbségeivel (Martinez 2013).

A máj extrakciós hatásfoka alapján mindössze a kvetiapint tekinthettük magas extrakciójú hatóanyagoknak ( $E > 0,7$  „high extraction drug”) mind a négy fajban, míg a karbamazepin és a klonazepam átlagos vagy alacsony extrakciójú hatóanyagoknak bizonyultak ( $0,7 > E > 0,3$  „intermediate extraction drug”;  $E < 0,3$  „low extraction drug”) (10.B ábra). Mivel a hatóanyagokkal végzett klinikai vizsgálatok eredményei fellelhetők az irodalomban (Gilman 1985; White 2005; Mauri 2007; Hiemke 2011), összevetettük a humán primer májsejtek „intrinsic clearance” értékeiből becsülhető *in vivo* biohasznosulást a klinikai vizsgálatokból nyert adatokkal is (10.C ábra). Jó egyezést figyelhettünk meg a becsült és az *in vivo* meghatározott biohasznosulási adatok között ( $r^2 = 0,72$ ), ami a primer hepatocita modell farmakokinetikai vizsgálatokban való alkalmazhatóságát és *in vivo* predikciós értékét támasztja alá.

Számos fejlesztés alatt álló gyógyszerjelölt *in vitro* farmakokinetikai viselkedését is vizsgáltuk májsejt modellen, publikálási engedélyt azonban csak a Lek Pharmaceuticals d.d. (Ljubljana, Szlovénia) gyógyszergyártól kaptunk a LK-935 és LK-980 jelű CYP51 enzim-gátló, koleszterinszint-csökkentő hatóanyagokra (**D2**, **D3**).

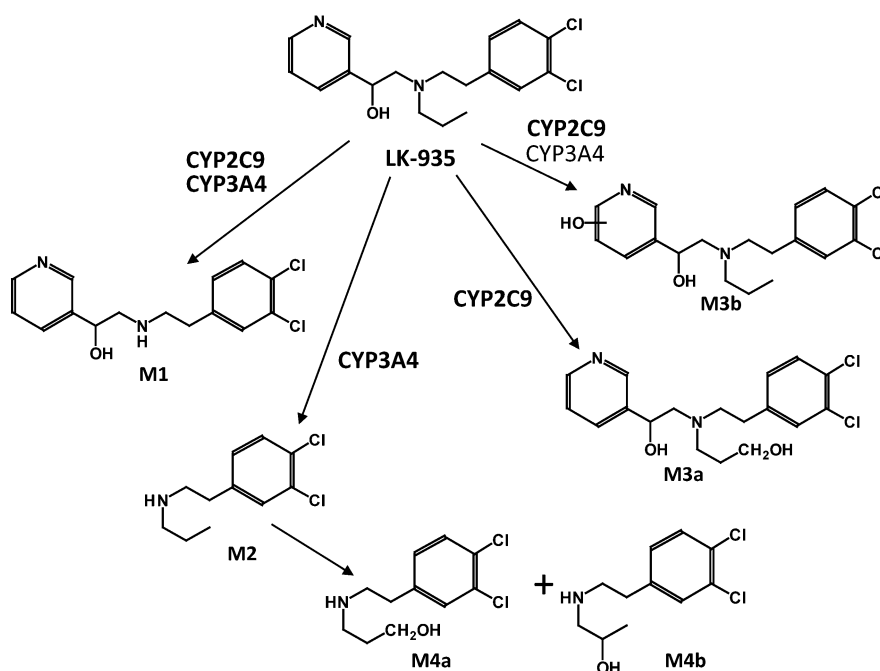


11. ábra: A Lek Pharmaceuticals d.d. által fejlesztett CYP51-gátló, koleszterinszint-csökkentő hatóanyagok (LK-935, LK-980) szerkezete.

A szerkezetét tekintve egymáshoz közel álló két vegyület (11. ábra) humán hepatocitákon tapasztalt farmakokinetikai viselkedése jócskán eltért. Humán májsejtekben a LK-935 intenzíven metabolizálódott ( $Cl_{int}$ :  $198,7 \pm 67,32$  ml/min/kg) és a becsült máj extrakciós hatásfok alapján magas extrakciójú hatóanyagként minősült ( $E$ : 0,94) (D2). Ezzel szemben a LK-980 meglehetősen stabilnak bizonyult, alacsony extrakciójú vegyületként minősítettük ( $E < 0,3$ ) (D3).

#### 4.1.2 Gyógyszerjelöltek metabolizmus vizsgálata primer májmodelleken (D2, D4)

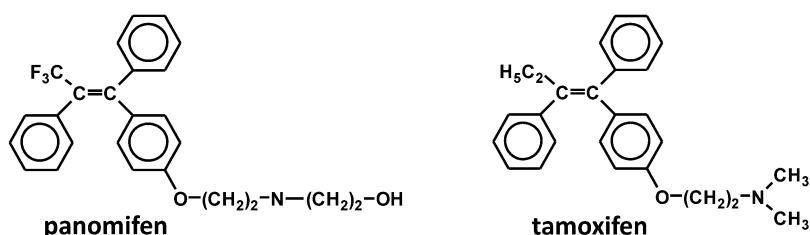
A primer hepatocita és a máj mikroszóma alkalmas modellt jelenthet a gyógyszerjelöltek biotranszformációjának meghatározására és a metabolikus útvonalak feltárására a fejlesztés korai időszakában. Az *in vitro* megközelítés előnye, hogy az inkubálás során a szerkezet-azonosításhoz elegendő mennyiségben és tisztaságban termelődnek a metabolitok. A koleszterinszint-csökkentő LK-935 (Lek Pharmaceuticals d.d.), valamint a nem-szteroid, ösztrogén receptor antagonistá panomifen (EGIS Gyógyszergyár ZRt.) példáján keresztül mutatom be a primer májmodellek alkalmasságát metabolizmus vizsgálatokra (D2, D4).



12. ábra: A koleszterinszint-csökkentő **LK-935** metabolizmusa humán májsejtekben és a metabolikus lépéseket katalizáló CYP enzimek (ld. 4.1.3).

Humán májsejtekben a LK-935 meglehetősen gyors metabolizmusa során (ld. 4.1.1) 6 metabolit képződését detektáltuk (**D2**). A metabolitok tömegspektrometriás szerkezet-azonosítása azt jelezte, hogy az anyavegyület átalakulása elsősorban *N*-dealkilációval és kisebb mértékben hidroxilációval történt (12. ábra). A két fő metabolit (M1 és M2) a propil csoport, illetve a hidroxietil-piridin rész a molekula központi nitrogénjéről (tercier aminről) való lehasadásával jött létre, míg a két monohidroxi-metabolit a propil oldallánc (M3a), valamint a piridin-gyűrű (M3b) hidroxilezésével képződött. A hidroxietil-piridin lehasadásával keletkezett M2 metabolitból a propil-lánc hidroxilezésével két további minor metabolit (M4a és M4b) is képződött.

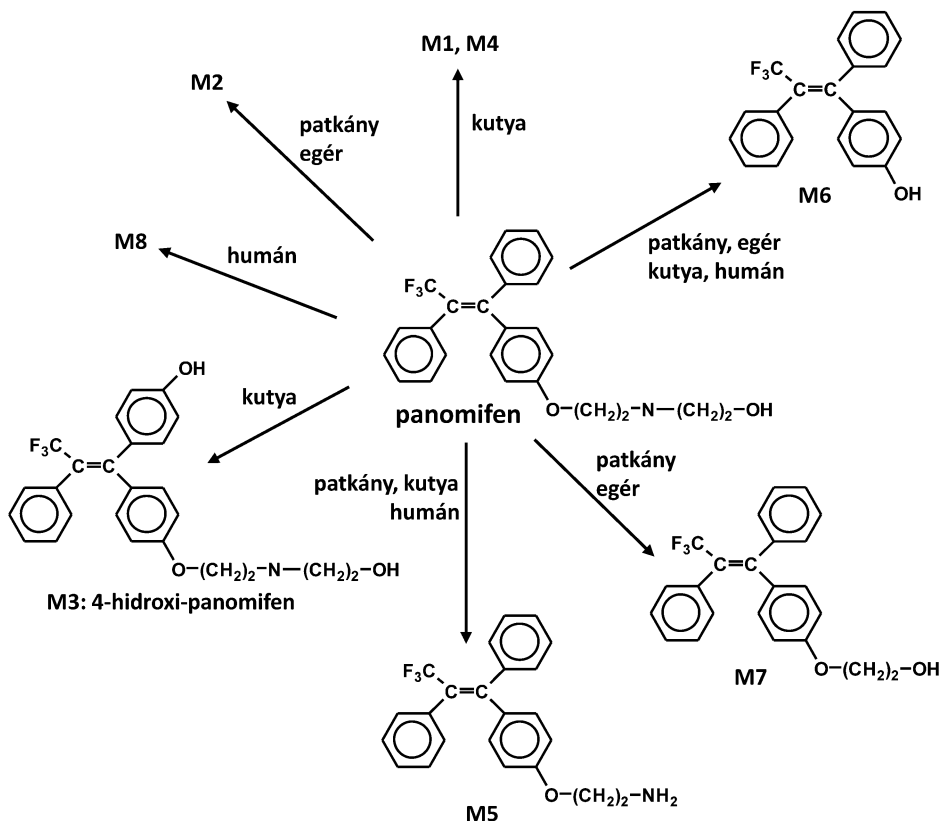
A máj mikroszóma preparátumok szintén alkalmazhatók gyógyszer-metabolizmus vizsgálatokra, azonban szem előtt kell tartani, hogy hosszú inkubálási időt nem tervezhetünk, mivel az enzimek 90 percen túl már jelentősen veszítenek aktivitásukból. A panomifen metabolikus útvonalainak feltérképezése egyike volt a legizgalmasabb preklinikai *in vitro* vizsgálatainknak. A tamoxifen analóg, ösztrogén receptor antagonistá vegyület, a panomifen mikroszómális metabolizmusa során összehasonlítottuk a patkány, egér, kutya és a humán metabolit-profil, továbbá összevetettük a panomifen és a tamoxifen (13. ábra) humán metabolikus útvonalait (**D4**).



13. ábra: A panomifen és a tamoxifen szerkezete

Nyolc különböző panomifen metabolit képződött a mikroszómális inkubálások során (14. ábra), azonban mindössze egy közös metabolitot, a teljes hidroxietil-aminoetoxi oldallánc-vesztett metabolitot (M6) azonosítottuk mind a négy fajban. Az oldallánc rövidüléssel létrejött közti termékek közül a hidroxietil-amino csoport lehasadásával keletkező metabolit (M7) patkány és egér máj mikroszóma inkubátumokban volt azonosítható, míg a hidroxietil-csoport vesztett metabolit (M5) patkány, kutya és humán mikroszómában képződött. Mivel az alkil-aminoetoxi oldallánc szükséges az anti-ösztrogén aktivitáshoz (Murphy 1991), az oldalláncot érintő változások a molekula inaktiválódásához vezetnek. A három, kizárólag kutya mikroszómális inkubálás során képződött metabolit (M1, M3, M4) közül az M3, a 4-hidroxi-panomifen szerkezetét azonosítottuk. A tamoxifen hasonló metabolikus útvonala emberben a 4-hidroxi-tamoxifen keletkezéséhez vezet, amely egyfelől anti-ösztrogén aktivitással rendelkezik, ugyanakkor nem-kívánatos DNS-addukt képződését is eredményezi (Moorthy 1996). Tehát emberben a panomifen 4-hidroxilezési útvonal hiánya előnyösnek tekinthető. További előnyt

jelenthet a tamoxifennel szemben, hogy a reaktívnek tekintett epoxid-származék képződését nem detektáltuk a panomifen metabolizmusa során. Ugyanakkor humán mikroszómával való inkubálás egy humán-specifikus metabolit, az M8 termelődéséhez vezetett, amelynek szerkezet-azonosítása a hidroxietil-aminoetoxi oldalláncon bekövetkezett kettőskötés kialakulását valószínűsítette. Az M8 metabolit kizárólag emberben való képződése nem túl előnyös, mivel a laboratóriumi állatokon (patkány, egér, kutya) végzett biztonsági vizsgálatok nem adnak tájékoztatást az M8 esetleges nem-kívánatos hatásairól.



14. ábra: Az ösztrogén receptor antagonist **panomifen** metabolizmusában mutatkozó faji eltérések

#### 4.1.3 Gyógyszer-hatóanyagok metabolizmusát katalizáló enzimek azonosítása (enzim-térképezés) (D2, D5-7)

Az enzim-térképezés, amelyet metabolikus reakció fenotipizálásnak („reaction phenotyping”) is neveznek, azt a célt szolgálja, hogy megbecsülje a hatóanyag humán alkalmazása során várható, genetikai és nem-genetikai tényezőknek köszönhető polimorf metabolizmus kockázatát. A vizsgálatok többnyire humán májszövetből izolált szubcelluláris frakciókon zajlanak, rekombináns enzimeket inkább csak az eredmények megerősítésére alkalmaznak. Az enzim-térképezés mikéntjét, a vizsgálatok felépítését két gyógyszerjelölt, a LK-935 (Lek Pharmaceuticals d.d.) és a deramciklan (EGIS Gyógyszergyár ZRt.), valamint a CYP2E1, illetve a CYP2C9

enzimek szelektívnek tekintett szubsztrátjai, a *p*-nitrofenol és a 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin példájával illusztrálom (**D2**, **D5-7**).

A LK-935 *in vitro* farmakokinetikai viselkedését és a májsejtekben képződött metabolitok szerkezete alapján felállított metabolizmus útvonalakat az előző fejezetekben ismertettem (ld. 4.1.1 és 4.1.2) (**D2**). Humán máj mikroszómában történő metabolizmus során a LK-935 metabolitok kizárólag akkor képződtek, ha NADPH-t is tartalmazott az inkubációs elegy, amely a monooxigenáz enzimek aktivitására világított rá. Az azonos kofaktor (NADPH) igény miatt a flavin monooxigenázok és CYP enzimek aktivitásának elkülönítésére a kétféle monooxigenáz eltérő hő-érzékenységet használtuk ki. A máj mikroszóma preparátum 45°C-os előkezelése nem befolyásolta a LK-935 metabolitok képződését, ami kizárta a hő-érzékeny flavin monooxigenázok aktív közreműködését. Az egyes metabolikus lépéseket katalizáló CYP enzimek aktivitását CYP-szelektív kémiai gátlószerekkel azonosítottuk. A CYP2C9-szelektív szulfafenazol és a CYP3A4-szelektív ketokonazol jelenlétében szignifikánsan csökkent a LK-935 metabolitok termelődése, míg a CYP2B6 és CYP2C19 enzimek gátlása nem befolyásolta a LK-935 metabolizmusát. Különböző CYP2C9 és CYP3A4 gátlószert, illetve LK-935 koncentrációk alkalmazásával (a *K<sub>i</sub>* gátlási állandók meghatározásával) megállapítottuk (12. ábra), hogy 1) a propil oldallánc lehasadását mind a CYP2C9, mind a CYP3A4 enzim katalizálta, 2) a hidroxietil-piridin lehasadása a CYP3A4 aktivitásának volt köszönhető, 3) a propil oldallánc hidroxilezését kizárólag a CYP2C9 enzim végezte, 4) míg a piridin-gyűrű hidroxilezését mindkét enzim katalizálta, bár a CYP3A4 egy nagyságrenddel magasabb *K<sub>i</sub>* mellett (részletek a **D2** publikációban).

A deramciklan metabolizmusában szerepet játszó CYP enzimek azonosítását hasonló módon végeztük (**D5**), mint a fentiekben bemutatott LK-935 gyógyszerjelölt enzim-térképezését. Mivel patkány és humán primer hepatocitákban a deramciklan metabolizmusa hasonlóan bizonyult (a részleteket a Függelék 12.3 és a **S20** publikáció tartalmazza), az enzim-térképezést mindkét fajból származó máj mikroszómán elvégeztük. A CYP-szelektív gátlószerek (CYP1A2:  $\alpha$ -naftoflavon; CYP2C9: szulfafenazol; CYP2D6: kinidin; CYP2E1: dietil-ditiokarbamát; CYP3A4: troleandomicin) több CYP enzim szerepére is rávilágítottak a deramciklan oldalláncának módosításában (*N*-dezmetil deramciklan, fenilborneol képződés), illetve a molekula hidroxilezésében (kámfor-rész metil-csoportján vagy a kámfor-gyűrű szénatomjain), azonban a CYP2E1 enzim jelentőségét külön ki kell emelni. Dietil-ditiokarbamát (CYP2E1-szelektív gátlószert) jelenlétében a deramciklan metabolitok képződése jelentősen visszaszorult, míg az izoniaziddal (CYP2E1-szelektív induktorral) kezelt patkányokból származó máj mikroszóma preparátumok számos metabolit (fenilborneol, hidroxideramciklan és *N*-dezmetil hidroxideramciklan metabolitok) fokozott termelődéséhez vezettek. Nem ritka, hogy egy vegyület

szubsztrátja valamely CYP enzimnek és egyben gátolja is az adott enzim működését, ezért kézenfekvő volt a kérdés, hogy a deramciklan vagy fő metabolitja, a *N*-dezmethyl deramciklan befolyásolja-e a CYP2E1 aktivitását. Humán máj mikroszómában igazoltuk, hogy sem az anyavegyület, sem *N*-demetilezett metabolitja közvetlenül nem okozott változást a CYP2E1-szelektív klórozoxon 6-hidroxiláz aktivitásban. A mechanizmus-alapú gátlás tesztelésére is van lehetőség a gyógyszerjelölttel végzett előinkubálás után történő CYP-szelektív enzimreakció vizsgálatával. A deramciklannal, vagy metabolitjával, a *N*-dezmethyl deramciklannal végzett előinkubálás során olyan metabolit vagy metabolitok képződtek, amelyek gátolták a CYP2E1 aktivitását ( $K_i$ :  $39,3 \pm 4,0 \mu\text{M}$ ).

A CYP enzimek aktivitásának jellemzésére rendkívül előnyös olyan szubsztrátot és reakciót választani, amelynek során a képződő metabolit detektálása egyszerű fotometriás vagy fluoreszcencia méréssel megoldható, azonban mindenképp szükséges igazolni a reakció CYP-szelektivitását és alkalmazhatóságát az *in vitro* kísérleti körülmények között (máj mikroszómán, hepatocitákon vagy cDNS expresszált CYP enzimeken). Egyszerűsége miatt a *p*-nitrofenol hidroxilezését, valamint a 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin *O*-demetilezését előszeretettel javasolták a CYP2E1, illetve a CYP2C9 enzim aktivitásának meghatározására (Reinke 1985; Koop 1989; Crespi 2002). A *p*-nitrofenolból képződő 4-nitro-katekol mennyisége fotometriásan, míg a 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarinból képződő 7-hidroxi-4-trifluormetil-kumarin fluoreszcencia méréssel gyorsan és egyszerűen meghatározható (Függelék 12.4). Máj mikroszómában végzett vizsgálataink alapján azonban kételyek merültek fel a két szubsztrát CYP2E1-, illetve CYP2C9-szelektivitásával kapcsolatban. CYP-szelektív kémiai gátlószerekkel történő enzim-térképezés alapján megállapítottuk, hogy a *p*-nitrofenol hidroxilezéséhez a CYP2E1 mellett a CYP2A6 és a CYP2C19 enzimek is nagymértékben hozzájárultak, így a *p*-nitrofenol nem használható CYP2E1-szelektív próba-szubsztrátként máj mikroszómális vagy hepatocita CYP2E1 aktivitás jellemzésére (**D6**). Továbbá a 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin sem tekinthető CYP2C9-szelektív próba-szubsztrátnak. CYP-szelektív gátlószerekkel végzett enzim-térképezés alapján a vegyület *O*-demetilezése sokkal inkább volt több CYP enzim (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4), mint CYP2C9-specifikus aktivitásnak köszönhető (**D7**). Az enzim-térképezés eredményeit megerősítettük 1) humán máj mikroszóma panel (32 donorból származó) CYP-marker aktivitásainak és 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin *O*-demetiláz aktivitásának korrelációs analízisével, 2) valamint cDNS expresszált egyedi humán CYP enzimek 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin *O*-demetiláz aktivitásának vizsgálatával is. A 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin *O*-demetiláz, valamint a humán CYP-szelektív enzimaktivitások (CYP2A6: kumarin 7-hidroxiláz; CYP2B6: *S*-mefenitoin *N*-demetiláz; CYP2C9: tolbutamid

4-hidroxiáz; CYP2C19: *S*-mefenitoin 4'-hidroxiáz; CYP2E1: klórozoxazon 6-hidroxiáz; CYP3A4: midazolam 4-hidroxiáz) közti többszörös összehasonlítás szignifikáns összefüggést jelzett ( $N=32$ ,  $r^2=0,8478$   $P<0,0001$ ). Korreláció volt kimutatható a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin *O*-demetiláz és a CYP2B6, illetve a CYP2E1-marker aktivitások között ( $r=0,7496$  és  $0,7969$ ,  $P<0,01$ ). A cDNS expresszált humán CYP enzimekkel végzett metabolizmus eredményei alapján megállapítható volt, hogy a CYP2E1 jelentős mértékben, a CYP2C19, CYP2C9 és CYP2B6 enzimek kisebb mértékben járultak hozzá a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin *O*-demetilázásához (CYP2E1: 59,5%, CYP2C19: 16,7%, CYP2C9: 14,1%, CYP2B6: 7,4%). Mindezek megerősítették, hogy a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin nem CYP2C9-szelektív szubsztrát.

#### 4.1.4 Paracetamolból történő toxikus metabolit képződésének kivédése CYP aktivitás gátlással (D8)

A széles körben használt, vény nélkül kapható láz- és fájdalom-csillapító paracetamol (acetaminofen) terápiás dózisban biztonsággal alkalmazható, azonban magas dózisban májkárosodást idézhet elő. A paracetamol metabolizmusa (Függelék 12.5, S25) során főként glukuronid- és szulfát-konjugátumok képződnek, amelyek elsősorban a vizelettel és kisebb mértékben az epével ürülnek. A kisebb jelentőségű CYP-metabolizmus egyrészt az inaktív 3-hidroxi-paracetamol, másrészt a rendkívül reaktív *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin (NAPQI) termelődéséhez vezet, amelyek glutationnal konjugálódva ürülnek a szervezetből. Paracetamol túladagolás esetén azonban a májsejtekben elfogynak a glukuronid- és szulfát-konjugációhoz szükséges kofaktorok és a metabolizmus egyre inkább a CYP enzimek felé terelődik. A sejtekben rendelkezésre álló redukált glutation is véges, így a reaktív NAPQI fehérjékhez kovalensen kötődik, ezzel a fehérjék működésképtelenné válnak, amely végül májkárosodáshoz vezet (S25). Paracetamol mérgezés esetén alkalmazott gyors antidótum (*N*-acetyl-cisztein) kezelés kivédheti a NAPQI toxikus hatását, míg feltevésünk szerint a NAPQI képződéséért felelős CYP enzim(ek) szelektív gátlása megakadályozhatja a NAPQI termelődését és hozzájárulhat a mérgezéses esetek hatékony kezeléséhez. A hipotézis igazolásához első lépésként olyan módszerre volt szükség, amely alkalmas a mikroszómális NAPQI termelődés detektálására (S24, D8). A humán máj mikroszómával végzett paracetamol metabolizmus során a CYP enzimek működéséhez szükséges NADPH mellett redukált glutation hozzáadásával értük el, hogy ne a mikroszómális fehérjékhez kötődjön a NAPQI, hanem paracetamol-glutacion konjugátum képződjön, amelyet kromatográfiásan azonosítottunk (HPLC-radiodetektálás). Következő lépésként humán máj mikroszóma panelen (6 különböző donortól származó mikroszóma preparátumon) alacsony és magas paracetamol koncentráció (50 és 250  $\mu\text{M}$ ) mellett összehasonlítottuk a NAPQI termelődés

mértékét a CYP-marker aktivitásokkal (CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4). Alacsony paracetamol koncentrációnál nem találtunk kitüntetett enzimet, míg magas koncentrációnál (paracetamol túladagolás modelljeként) a NAPQI képződés szoros korrelációt mutatott a CYP2E1 aktivitással (N=6,  $r^2=0,9381$ ,  $P<0,0001$ ) (**D8**). CYP-szelektív kémiai gátlószerekkel végzett enzim-térképezés során megállapítottuk, hogy a CYP2E1 és CYP2A6 gátlószerek (diethyl-ditiokarbamát és 8-metoxipsoralen) jelenlétében szignifikánsan csökkent a NAPQI képződés. Végül olyan, CYP2E1 gátló hatásúnak tartott vegyületeket teszteltünk, amelyek a betegek kezelésére is alkalmasak lehetnek. A 4-metilpirazol, a diszulfiram és annak metabolitja, a diethyl-ditiokarbamát bizonyult a leghatékonyabbnak a NAPQI termelődés megakadályozásában ( $IC_{50}$  50  $\mu$ M, 8  $\mu$ M és 33  $\mu$ M). A diszulfiram (Antaethyl, Antabuse), amely alkohol intoleranciát okoz, így az alkohorról való leszokást segíti elő, alkalmas lehet a paracetamol mérgezés kivédésére. A 4-metilpirazol (Fomepizole) egy alkohol dehidrogenáz gátló vegyület, etilén-glikol és metanol mérgezés kezelésére alkalmazzák, szintén hatékony eszköze lehet a paracetamol toxicitás csökkentésének. Különösen előnyös, hogy intravénás 4-metilpirazol készítmény is rendelkezésre áll. Ugyanakkor a cimetidin, amit a klinikai gyakorlatban sok helyütt használtak paracetamol mérgezés kezelésére, egyáltalán nem befolyásolta a NAPQI képződést, ezért alkalmazását a toxicitás mérséklésére feleslegesnek tekinthetjük (**D8**). Számos CYP2E1 gátlószernek tartott hatóanyag (klórpromazin, diklofenak, flufenazin, tioridazin) ugyancsak nem függesztette fel a NAPQI képződést, amit azzal magyaráztunk és kísérletesen is igazoltunk, hogy a *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása alapján CYP2E1 gátlószernek tekintett vegyületek valójában nem a CYP2E1 működését blokkolták, hanem egyéb CYP enzimeket (pl. CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4) (4.1.3 fejezet; **D6**). Az izoniazid kismértékben ugyan megakadályozta a NAPQI képződést (**D8**), azonban CYP2E1 indukáló hatása miatt nem tartottuk alkalmasnak paracetamol mérgezés kivédésére. A diallil-szulfid a fokhagymában található vegyület, mérsékelten gátolta a NAPQI képződését, azonban jelenleg nincs klinikai alkalmazásban. Összességében a 4-metilpirazol és a diszulfiram alkalmazását érdemes megfontolni a paracetamol mérgezés korai időszakban történő kezelésére.

#### 4.1.5 CYP indukcióra visszavezethető gyógyszer-kölcsönhatások (**D2, D3, D9**)

A CYP enzimek indukciója szintén magában hordozza a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások kockázatát, ezért a fejlesztés során javasolt a gyógyszerjelöltek CYP-indukáló sajátságainak feltárása. A gyógyszerjelöltek CYP-indukáló képességét korábban laboratóriumi állatokon tesztelték, azonban a fajok között mutatkozó különbségek miatt megbízhatóbb eredményre lehet számítani humán hepatocitákon végzett vizsgálatokból. Három gyógyszerjelölt, a koleszterinszint-csökkentő LK-935 és LK-980 (Lek Pharmaceuticals d.d.), valamint az AMPA



antagonista GYKI-47261 (IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft., Budapest) példáján keresztül szemléltetem a primer májsejteken végzett CYP-indukciós vizsgálatok menetét (**D2, D3, D9**).

A forgalomban lévő koleszterinszint-csökkentők egyik hátránya, hogy farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások forrásai. Az atorvasztatinról ismert, hogy aktiválja a humán PXR és CAR nukleáris receptorokat és a *CYP2B6*, valamint *CYP3A4* transzkripcióját fokozza, ezzel számos párhuzamosan alkalmazott *CYP2B6* és *CYP3A4* szubsztrát metabolizmusát felgyorsítja (El-Sankary 2001; Kocarek 2002; Kobayashi 2005). A Lek Pharmaceuticals d.d. felkérésére megvizsgáltuk, hogy a gyógyszerjelölt LK-935-nél és a LK-980-nál mennyiben sikerült kiküszöbölni a CYP indukcióra visszavezethető gyógyszer-kölcsönhatásokat. A gyógyszerjelöltek CYP-indukáló képességét humán primer hepatocitákon tanulmányoztuk összevetve a rifampicin (CYP induktor) referencia vegyület, valamint az atorvasztatin és a rosuvasztatin okozta indukcióval (**D2, D3**). Az indukciót több szinten, CYP mRNS és enzim-fehérje expresszió, valamint CYP enzimaktivitás szintjén is detektáltuk, míg az indukció mechanizmusát HepG2 sejtekben humán PXR és CAR nukleáris receptorokat (hPXR, hCAR), valamint a *CYP3A4* promóter régióját expresszáló luciferáz riporter esszében teszteltük (3. táblázat).

Humán májsejtekben az atorvasztatin expozíció okozta PXR és CAR aktiválás következményeként indukálódott a *CYP2B6* és *CYP3A4* gének transzkripciója, amely megnövekedett *CYP2B6* és *CYP3A4* enzimaktivitást eredményezett. A már ismert *CYP2B6* és *CYP3A4* indukción túl kimutattuk, hogy az atorvasztatin kezelés fokozott *CYP2C9* mRNS expresszióhoz és enzimaktivitáshoz is vezetett. A rosuvasztatin szintén megemelte a *CYP2B6*, *CYP2C9* és *CYP3A4* mRNS expresszióját, amelynek hátterében a CAR aktiválása áll, azonban csak a *CYP3A4* aktivitása fokozódott szignifikánsan a rosuvasztatin-kezelt sejtekben. A rifampicin, vagy a két sztatin okozta CYP indukcióhoz képest a LK-935 ugyanakkor csak enyhe *CYP3A4* mRNS expresszió és aktivitás emelkedést eredményezett a primer májsejtekben. Az LK-935 kezelés HepG2 sejtekben (humán máj daganatos sejtvonal) ugyanakkor a rifampicinnel összemérhető PXR aktiválást váltott ki (a hCAR-t egyáltalán nem aktiválta), ami látszólag ellentmondásban van a primer hepatocitákban detektált kismértékű, a rifampicinétől messze elmaradó *CYP3A4*-indukáló képességgel. Az ellentmondás azzal magyarázható, hogy a HepG2 sejtek gyógyszer-metabolizáló képessége nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a primer hepatociták metabolikus aktivitása (Wilkening 2003). Humán primer májsejtekben a *CYP3A4* és *CYP2C9* enzimek intenzíven alakították át a LK-935-t (ld. 4.1.1), ami a PXR aktiváláshoz szükséges LK-935 koncentráció gyors csökkenését eredményezte (**D2**), míg a HepG2 sejtekben a *CYP3A4* nem mutatható ki és a *CYP2C9* is csak elhanyagolható mennyiségben. Ezért a LK-935 klinikai alkalmazásakor valószínűleg enyhe vagy elhanyagolható mértékű, CYP indukcióra

3. táblázat: A rifampicin, az atorvasztatin, a rosuvasztatin és a LK-935 okozta változások humán hepatocitákban és HepG2 sejtekben

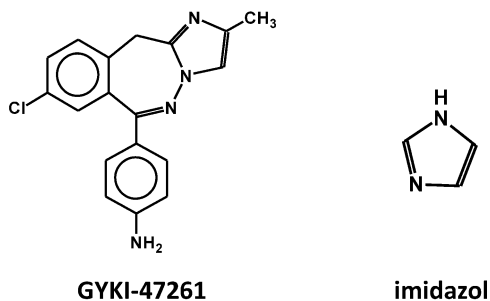
	Rifampicin (5 µM)	Atorvasztatin (10 µM)	Rosuvasztatin (10 µM)	LK-935 (10 µM)
<b>CYP mRNS expresszió (N=7)<sup>a</sup></b>				
CYP2B6	XX	XX	X	-
CYP2C9	XX	X	X	-
CYP2C19	X	-	-	-
CYP3A4	XXX	XXX	XX	X
<b>CYP enzimaktivitás (N=4)<sup>b</sup></b>				
CYP2B6: mefenitoin <i>N</i> -demetiláz	XX	X	-	-
CYP2C9: tolbutamid 4-hidroxiláz	X	X	-	-
CYP2C19: mefenitoin 4'-hidroxiláz	X	-	-	-
CYP3A4: nifedipin oxidáz	XXX	XXX	X	X
<b>CYP enzimfehérje (N=7)<sup>b</sup></b>				
CYP3A4	XXX	XX	X	X
<b>nukleáris receptor aktiválás<sup>c</sup></b>				
hPXR	XX	X	-	XX
hCAR	-	X	X	-

<sup>a</sup>24-órás expozíció; <sup>b</sup>48-órás expozíció; <sup>c</sup>hPXR-al, illetve hCAR-al transzfektált HepG2 sejtekben; XXX >10-szeres, XX >5-szörös, X ≥2-szeres változás a kontroll sejtekhez képest

visszavezethető gyógyszer-kölcsönhatásra lehet számítani. A szerkezetileg közel álló LK-980 (11. ábra) ugyanakkor nem váltott ki CYP3A4 mRNS expresszió és enzimaktivitás változást humán hepatocitákban (D3), ami kedvező tulajdonságnak tekinthető a sztatinokkal szemben.

A testidegen anyagok okozta CYP2E1 indukció más CYP enzimektől eltérően nem a transzkripció fokozódásával jön létre, hanem a CYP2E1 enzim-fehérje stabilizálásával, míg a CYP2E1 mRNS szint változatlan marad (ld. 1.5.2). Kihívást jelentett a látszólagos CYP2E1 indukció meghatározása primer hepatocitákban (D9), ugyanis „egy-sejt-réteg” kultúrában a májsejtek gyorsan veszítettek CYP2E1 aktivitásukból (klórzoxazon 6-hidroxiláz, 7-etoxikumarin *O*-dealkiláz), amely együtt járt a CYP2E1 fehérje eltűnésével. Azonban a pirazol, imidazol és a szerves oldószerek, mint az etanol, dimetil-szulfoxid, aceton, *i*-propanol, megakadályozták a CYP2E1 gyors degradációját. A leghatékonyabb CYP2E1 induktor az imidazol volt, ezért a GYKI-47261 jelű vegyület CYP2E1 indukciós vizsgálata során az imidazolt választottuk referencia induktornak. Primer hepatocitákban a GYKI-47261 gyógyszerjelölt hatékony CYP2E1 induktornak bizonyult, jelentős CYP2E1 aktivitás és enzim-fehérje szint emelkedést okozott a

kezeletlen májsejtekhez képest, ugyanakkor a *CYP2E1* gén transzkripcióját nem befolyásolta. A humán hepatociták lényegesen érzékenyebben reagáltak a GYKI-47261 kezelésre, mint a patkányból származó sejtek; humán májsejtekben a maximális *CYP2E1* indukciót 0,01  $\mu\text{M}$



15. ábra: A GYKI-47261 gyógyszerjelölt és a *CYP2E1* induktor referencia vegyület, az imidazol szerkezete

koncentráció váltotta ki, míg patkány hepatocitákban a maximális indukcióhoz 10  $\mu\text{M}$  GYKI-47261-re volt szükség. A GYKI-47261 imidazol része magyarázatul szolgálhat a *CYP2E1* indukáló sajátosságára, azonban a molekula egyéb részei is szerepet játszhatnak a *CYP2E1* stabilizálásában (15. ábra).

#### 4.1.6 Súlyos toxicitáshoz vezető tiamulin-monensin kölcsönhatás hátterének feltárása (D10)

A farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások nemcsak a humán klinikai gyakorlatban jelenthetnek nehézségeket, de az állat-gyógyászatban is okozhatnak komoly következményekkel járó problémákat. Az Állatorvostudományi Egyetem (Budapest) megkeresésére tártuk fel a főként baromfiaknál alkalmazott tiamulin és monensin között fellépő, súlyos tünetekhez vezető kölcsönhatás hátterét (D10). A monensin egy szűk terápiás indexű ionofór antibiotikum, amelyet coccidiosis megelőzésére alkalmaznak, míg a tiamulin egy diterpén antibiotikum, a tüdőt és a béltraktust érintő fertőzések kivédésére használatos. A két antibiotikum együttes alkalmazása során monensin túladagolásra jellemző tünetek (étvágy csökkenés, levertség, ataxia, láb gyengeség, hányás) jelentkeznek az állatoknál, amely a feltevések szerint a tiamulin hatására bekövetkező monensin elimináció csökkenésével magyarázható.

A monensin metabolizmusának első lépése az *O*-demetilezés. Patkány máj mikroszómán végzett enzim-térképezés során megállapítottuk, hogy az *O*-demetilezési reakciót főként a CYP3A1/2 enzimek katalizálták és kisebb mértékben a CYP1A2 és CYP2E1 enzimek is hozzájárultak a demetilezett metabolit képződéséhez. Patkányokon végzett *in vivo* vizsgálataink alapján azt tapasztaltuk, hogy a tiamulin kezelés az ismert induktor vegyületekkel (fenobarbitál, dexametazon, troleandomicin) összemérhető CYP3A indukciót okozott a májban; megemelte a CYP3A1 enzim-fehérje expressziót és a CYP3A enzimaktivitást (etilmorfin és aminopirin *N*-demetiláz

aktivitások), továbbá fokozta a monensin *O*-demetilézését is. Mindez látszólag ellentmondásban van a klinikai tapasztalatokkal, amelyek sokkal inkább a tiamulin okozta gyógyszer-metabolizáló képesség csökkenését sejtetik. A tiamulin a CYP3A enzimek indukcióján túl gátolta is az *in vitro* CYP3A aktivitásokat, az etilmorfin és aminopirin *N*-demetilézését, valamint a monensin *O*-demetilézését. Hasonló jelenség ismert a troleandomicin esetében is, ugyanis a troleandomicin képes indukálni a CYP3A expressziót és enzimaktivitást, másrészt közvetlenül gátolja a CYP3A működést, metabolikus intermedier komplexet képez az enzimmel és mechanizmus alapú CYP3A gátlószerként viselkedik (Yamazaki 1998). A tiamulin ugyan gátolta a CYP3A aktivitást, metabolikus intermedier komplex képződését azonban nem tudtuk kimutatni: 1) a tiamulin-kezelt patkány máj mikroszómában a ferricianid nem eredményezett aktivitás növekedést, szemben a troleandomicin-kezelt állatok mikroszómális aktivitásaival, ahol a ferricianid felszabadította a CYP3A enzimeket a metabolikus intermedier komplexből; 2) spektrálisan sem detektáltunk metabolikus intermedier képződést a máj mikroszómához közvetlenül adagolva a tiamulint még egészen magas (5 mM) koncentrációban sem. Azt a következtetést vontuk le az eredményekből, hogy a tiamulin ugyan kettős hatást gyakorolt a CYP3A enzimekre, indukálta a CYP3A expressziót és közvetlenül gátolta a CYP3A működést, azonban a monensinnel való kölcsönhatásban és a toxikus tünetek kialakulásában inkább a CYP3A gátlásnak van szerepe.

#### 4.1.7 KÖVETKEZTETÉSEK

A korai gyógyszerfejlesztési fázisban a gyógyszerjelöltek farmakokinetikai viselkedésének és metabolizmusának feltárása elengedhetetlen része a preklinikai biztonsági vizsgálatoknak. Olyan *in vitro* modellek fejlesztésére van igény, amelyek megbízhatóan képesek megbecsülni a hatóanyagok *in vivo* farmakokinetikai és metabolikus sajátosságait, továbbá a klinikai alkalmazás során várható polimorf metabolizmust és farmakokinetikai kölcsönhatásokat.

Kutatócsoportunkban (MTA Kémiai Kutatóközpont/Természettudományi Kutatóközpont) Magyarországon elsőként kezdtük meg az *in vitro* májmodellek (primer májsejt és máj mikroszóma modellek) alkalmazását a gyógyszerjelölt hatóanyagok biológiai stabilitásának meghatározására, az *in vivo* farmakokinetikai paraméterek becslésére és a metabolikus útvonalak feltárására. Forgalomban lévő pszichofarmakonok példáján keresztül igazoltuk, hogy a primer májsejt modellben nyert farmakokinetikai paraméterek és az azokból becsülhető humán biohasznosulás jó egyezést mutatott a klinikai adatokkal, azaz jó a primer májsejt modell *in vivo* predikciós értéke (**D1**). A laboratóriumi állatokból és humán májszövetből izolált hepatocitákban tapasztalt „clearance” érték eltérések azonban arra hívták fel a figyelmet, hogy a faji különbségekkel számolni kell az állatról emberre történő extrapoláció során. A humán májsejteken nyert információk rávilágíthatnak a hatóanyagok olyan sajátosságaira is, amelyek a biztonsági

vizsgálatok során a laboratóriumi állatokon nyert adatok alapján elkerülnék a figyelmet, ahogy azt Lombardo és munkatársai (2021) megállapították a **D1** publikáció nyomán. A patkány primer májsejteket emberre nézve relevánsnak tekintettük, míg a kutya és nyúl hepatocitákban zajló metabolizmus jelentősen eltért az emberétől. A panomifen (EGIS Gyógyszergyár ZRt.) máj mikroszómális metabolizmusa azonban már nem erősítette a patkány-humán hasonlóságot, a humán-specifikus panomifen-metabolit képződése pedig nehézséget jelenthet a toxikológiai vizsgálatok értékelése során (**D4**). Coleman és munkatársai (2001) szerint az emberre történő extrapoláció kizárólag az állatokfajokon nyert adatok alapján valós kockázatot rejt magában, amelyre példaként említették a panomifent. Ugyanakkor ha az *in vitro* modellek alapján a korai fejlesztési fázisban már ismertté válnak a laboratóriumi állatok és az ember farmakokinetikai és metabolizmus különbségei, az hozzájárulhat a biztonsági vizsgálatok eredményeinek értelmezéséhez.

A hatóanyagok átalakítását katalizáló CYP enzimek azonosítása alapján megbecsülhető, hogy a klinikai alkalmazás során számíthatunk-e polimorf metabolizmusra, vagy CYP-gátló, illetve indukáló vegyület jelenlétében a hatóanyag farmakokinetikai viselkedésének megváltozására. Ugyanis a hatóanyagok metabolizmusában részt vevő enzimek expressziójában és/vagy aktivitásában történő esetleges változások kihatással lehetnek a gyógyszerhatékonyságra és a nemkívánt mellékhatások kialakulására (Shah 2015a; Hahn 2021; Magro 2021). Különösen lényeges ez akkor, ha az adott gyógyszer-hatóanyag biotranszformációját egyetlen enzim katalizálja. A humán máj mikroszóma preparátumok alkalmas *in vitro* modellt jelentenek az enzim-térképezéshez, amelyet kutatócsoportunkban CYP-szelektív kémiai gátlószerekkel végzünk. Enzim-térképezéssel igazoltuk, hogy a LK-935 (Lek Pharmaceuticals d.d.) metabolizmusát a CYP3A4 és CYP2C9 enzimek katalizálják (**D2**), amelyből gyanítható, hogy a LK-935 klinikai alkalmazása során különbségekre lehet számítani a *CYP2C9* genetikai polimorfizmusa miatt, valamint a párhuzamosan alkalmazott *CYP2C9* és *CYP3A4* induktor vagy gátló hatású gyógyszer-hatóanyagok miatt, amelyre a gyógyszerfejlesztéssel kapcsolatos összefoglaló munkájukban Zhou és munkatársai (2009a) is felhívták a figyelmet a **D2** alapján. A deramciklan metabolizmusához ugyan több CYP enzim is hozzájárult, azonban a *CYP2E1* domináns szerepét igazoltuk (**D5**), ezért feltételezhető, hogy a deramciklan betegeknél történő alkalmazása során a *CYP2E1* működését befolyásoló tényezők (pl. *CYP2E1* indukáló hatás: éhezés, alkoholfogyasztás) módosíthatják az eliminációját. Míg a deramciklanból képződő metabolit(ok) *CYP2E1*-gátló hatása abban az esetben juthat érvényre, akkor változtatja meg a *CYP2E1* szubsztrátok (pl. klórozoxazon) farmakokinetikai viselkedését, ha a deramciklan terápiás vérkoncentrációja összemérhető a *CYP2E1* gátlási állandójával. Ugyancsak CYP enzim-térképezéssel állapítottuk meg, hogy a

CYP2E1-szelektív szubsztrátnak tartott *p*-nitrofenol hidroxilezését nemcsak a CYP2E1, de a CYP2A6 és CYP2C19 enzimek is katalizálják, így nem alkalmazható CYP2E1 aktivitást jellemző marker reakcióban (**D6**). Továbbá igazoltuk, hogy a *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitás gátlása alapján CYP2E1 gátlószereknek tekintett vegyületek (klotrimazol, mikonazol, klórpromazin, tioridazin, flufenazin, diklofenak) valójában nem annyira a CYP2E1, hanem egyéb CYP enzimek aktivitását gátolták, ezért a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatásaik újraértékelése szükséges. Az eredményinkre hivatkozva, Niwa és munkatársai (2005) antifungális szerek CYP-gátló sajátságairól szóló munkájukban külön kihangsúlyozták, hogy a mikonazol *p*-nitrofenol hidroxiláz aktivitást gátló hatása nem kizárólag a CYP2E1 aktivitás gátlásával magyarázható. Hasonló módon bizonyítottuk, hogy a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin nem tekinthető CYP2C9-szelektív szubsztrátnak, hiszen a CYP2E1, a CYP2C19 és a CYP2B6 is hozzájárult az *O*-demetilezéséhez (**D7**). Ezért a 7-metoxi-4-trifluorometil-kumarin heterogén, több CYP enzimet expresszáló rendszerekben (pl. máj mikroszóma, hepatocita) – bármennyire is szeretnénk – nem használható CYP izoenzim-szelektív aktivitás jellemzésére.

A gyógyszerbiztonság megteremtéséhez szintén hozzátartozik a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások, - a CYP enzim indukció és CYP enzim gátlás - előrejelzése. A primer májsejtek ugyancsak alkalmas *in vitro* modellt jelenthetnek a CYP indukció vizsgálatához, míg a hatóanyagok CYP-gátló képessége máj mikroszómában tesztelhető. A koleszterinszint-csökkentő sztatinok szinte mindegyike farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások kiváltója, ezért indokolt volt az új hatóanyagok (LK-935, LK-980) CYP-indukáló sajátságainak tesztelése (**D2**, **D3**). A LK-935 humán daganatos sejtvonalban (HepG2) mutatott, a rifampicinnel összemérhető PXR-aktiváló képessége erőteljes CYP3A4 indukciót és CYP3A4 szubsztrátokkal való kölcsönhatást vetített előre. Humán primer hepatocitákban azonban a LK-935 CYP3A4-indukáló képessége messze elmaradt a rifampicinétől, amely a gyors LK-935 metabolizmussal volt magyarázható. Az LK-980 pedig egyáltalán nem okozott CYP3A4 indukciót primer májsejtekben, ami mindenképp előnyös sajátság a sztatinokkal szemben. A nukleáris receptor aktiválással kiváltott *CYP* gén transzkripció fokozódás jól nyomon követhető volt humán májsejtekben, azonban a látszólagos CYP2E1 indukció igazolása nem tűnt ennyire egyértelműnek, mivel a primer májsejtek folyamatosan veszítettek CYP2E1-tartalmukból (**D9**). Ezért célszerű volt több, ismert CYP2E1 induktor vegyület CYP2E1 enzim-fehérje stabilizáló hatását is tesztelni a referencia vegyület kiválasztásához. Az imidazol, mint hatékony CYP2E1 induktor alkalmazható referenciaként a gyógyszerjelöltek CYP2E1-indukáló sajátságának vizsgálata során. A GYKI-47261 jelű vegyület (IVAX Gyógyszerkutató Intézet) az imidazolt meghaladó mértékben stabilizálta a CYP2E1 fehérjét és ezzel a kezeletlen sejtekhez képest fokozott CYP2E1 aktivitást idézett elő, amely nem

járt együtt CYP2E1 transzkripció fokozódásával. A GYKI-47261 CYP2E1-indukáló képessége magyarázható a vegyület imidazol részével, bár a molekula egyéb részei is hozzájárulhattak a CYP2E1 stabilizálásához, hiszen a GYKI-47261 hatékonyabb CYP2E1 induktornak bizonyult, mint az imidazol.

A bemutatott *in vitro* modellek és metodikák nemcsak gyógyszerjelöltek, de forgalomban lévő hatóanyagok farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatásainak felderítésére is alkalmazhatók. Így került az érdeklődésünk középpontjába az állatgyógyászatban használt két antibiotikum, a tiamulin és a monensin, amelyek kombinált alkalmazása során fellépő súlyos mellékhatások háttérében lévő gyógyszer-kölcsönhatásokat tártuk fel (**D10**). Bár a CYP indukció vizsgálatát *in vivo* patkány modellen végeztük, az enzim-térképezést, CYP gátlást és metabolikus intermediér komplex képződést *in vitro* máj mikroszóma preparátumon tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a tiamulin kettős hatást gyakorolt a CYP3A enzimekre, indukálta a CYP3A expressziót és közvetlenül gátolta a CYP3A működést metabolikus intermediér komplex képződése nélkül, azonban a monensinnel való kölcsönhatásban és a toxikus tünetek kialakulásában a CYP3A gátlásnak van meghatározó szerepe. A tiamulin okozta monensin metabolizmus gátlás veszélyeire külön figyelmeztetett az EFSA (European Food Safety Authorities) a monensinről összeállított anyagában (Alexander 2008; EFSA Panel on FEEDAP 2019). Egy másik igen érdekes gyógyszer-kölcsönhatás vizsgálatunk főszereplője a paracetamol volt (**D8**). A paracetamol mérgezés okozta májkárosodás mérséklésére az antidótum terápia mellett a reaktív paracetamol metabolit, a NAPQI képződésének csökkentése is alkalmas lehet, így a szervezet időt nyerhet a méregtelenítő folyamatokhoz szükséges kofaktorok pótlására. Azonban a klinikai gyakorlatban használt CYP-gátló cimetidinnről kimutattuk, hogy nem akadályozta meg a NAPQI termelődést, mivel nem gátolta a reaktív metabolit képződéséért felelős CYP2E1 és/vagy CYP2A6 enzimeket. Ugyanakkor javaslatot tettünk arra, hogy a 4-metilpirazol és a diszulfiram CYP2E1-gátló és NAPQI-t csökkentő tulajdonságát érdemes lenne kihasználni a paracetamol mérgezés korai időszakában. A NAPQI képződés gátlása, mint kezelési stratégia azóta ajánlásként megfogalmazódott a klinikai gyakorlatban (Langhammer 2014; Akakpo 2020), sőt paracetamol mérgezés esetén a 4-metilpirazolt sikerrel alkalmazták betegeknél (Shah 2020 és 2021; Akakpo 2022).

A kutatócsoportunkban meghonosított és finomhangolt primer májsejt, illetve máj mikroszóma modellek, valamint az *in vitro* farmakokinetikai, metabolizmus és gyógyszer-kölcsönhatás vizsgálatok ma már az FDA és az EMA (Európai Gyógyszerügynökség, European Medicines Agency) ajánlásaiban is szerepelnek (Sudsakorn 2020). A vizsgálatok eredményei segíthetik 1) egyrészt a gyógyszerjelölt *in vivo* várható kinetikai viselkedésének becslését, a farmakokinetikai szempontból az emberhez leginkább hasonló állatfaj azonosítását, humán

specifikus metabolit(ok) képződésének igazolását vagy kizárását, valamint a biztonsági (toxikológiai) vizsgálati eredmények értelmezését, 2) másrészt a klinikai alkalmazás során várható polimorf metabolizmus és a farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások kockázatának megítélését.

#### 4.2 A CYP metabolizmusban mutatkozó különbségek lehetséges okai

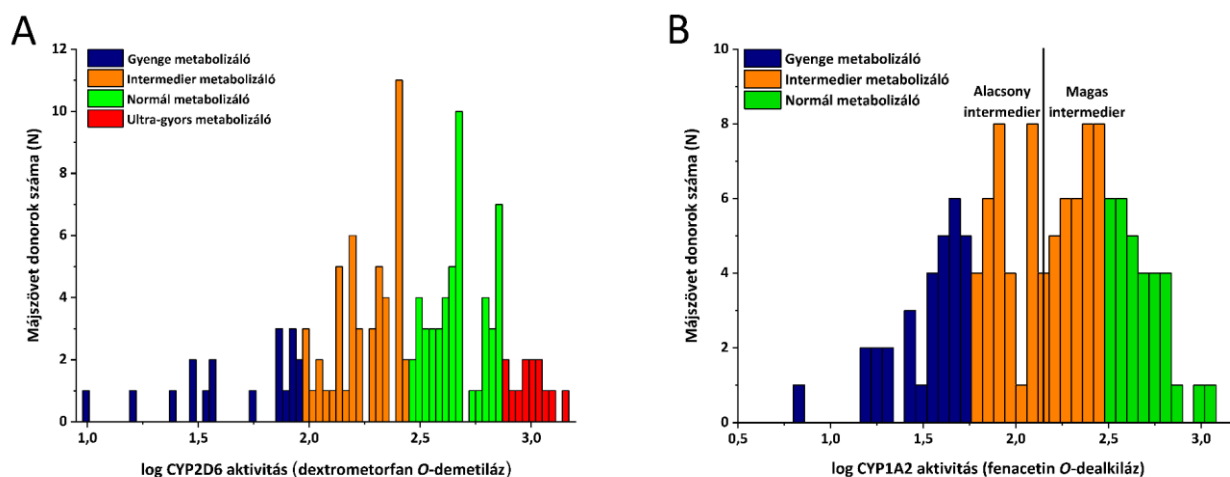
A főként a májban zajló gyógyszer-metabolizmus terén hatalmas különbségek tapasztalhatók a betegeknél, amelynek hátterében a metabolizmust katalizáló enzimek eltérő expressziója és/vagy aktivitása áll. A gyógyszer-metabolizáló enzimek fenotípusos megjelenését elsősorban az enzimek genetikai polimorfizmusai befolyásolják, azonban kihívást jelent maga a CYP genotípus - fenotípus megfeleltetés mikéntje, vagy a szubsztrát-szelektivitásból fakadó eltérések kezelése (Shah 2016). A Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) számos konkrét hatóanyagra vonatkozóan ajánlást (<https://cpicpgx.org/guidelines/>) fogalmazott meg a CYP genotípushoz igazított dózizásra, például a takrolimusz (CYP3A5), az efavirenz (CYP2B6), a klopidozrel (CYP2C19) hatóanyagokkal vagy a nem-szteroid gyulladáscsökkentőkkel (CYP2C9) kapcsolatban. A személyre szabott gyógyszeres kezelések egyik pillérének lehet tekinteni a CYP genotípus alapú gyógyszer-metabolizáló fenotípus becslést, amely azonban számos bizonytalanságot hordozhat magában. Hiszen a nem-genetikai tényezőknek (pl. kor, nem, gyógyszer-kölcsönhatásból fakadó enzim gátlás és indukció, stb.) köszönhető fenokonverzió időszakosan módosíthatja és így jelentősen torzíthatja a hatóanyagok biotranszformációjában részt vevő enzimek genotípusa alapján becsült aktivitást.

##### 4.2.1 A CYP metabolizmust befolyásoló genetikai és nem-genetikai tényezők azonosítása (D11-16, D20)

A CYP enzimek aktivitása és expressziója a májban akár sok százszoros különbséget is mutathat, amit magunk is megfigyeltünk a humán májszövet minták vizsgálata során (D11-14, D16, D20). A gyógyszer-metabolizmus szempontjából leglényegesebb CYP enzimeket a próbaszubsztrátokból való CYP-szelektív metabolit képződés sebességével jellemeztük (CYP1A2 fenacetin *O*-dealkiláz; CYP2B6 *S*-mefenitoin *N*-demetiláz; CYP2C9 tolbutamid 4-hidroxiláz; CYP2C19 *S*-mefenitoin 4'-hidroxiláz; CYP2D6 dextrometorfan *O*-demetiláz; CYP3A4/5 nifedipin oxidáz, midazolam 1'- és 4-hidroxiláz), amely sok esetben a mérhetetlenül alacsony aktivitástól az extrém magasig terjedt. A CYP aktivitások eloszlása alapján a fenotípus értékelésére a korábban általánosan elfogadott három, - gyenge, intermedier és extenzív metabolizáló - kategóriát használtuk (Ingelman-Sundberg 2007; Shah 2015a), az aktivitás kategóriák közti határértékeknek az első és a harmadik kvartilist tekintettük (részletek: D20



publikációban). A *CYP* gén multiplikáció és a fokozott expressziót eredményező variánsok miatt a CPIC *CYP* genotípus - fenotípus értékelésre vonatkozó ajánlásaival összhangban (Caudle 2017) a korábbi három-kategóriás felosztást kibővítettünk egy további, a fokozott metabolizmust jelző ultra-gyors metabolizáló kategóriával a *CYP2B6*, *CYP2C19* és *CYP2D6* enzimek esetén, amelyhez a mediánt (2. kvartilis) alkalmaztuk határértéknek (1. kvartilis: gyenge - intermedier; 2. kvartilis/medián: intermedier – normál; 3. kvartilis: normál - ultra-gyors metabolizáló közti határérték). Az egységes kiértékelés érdekében hasonlóan jártunk el a *CYP1A2*, *CYP2C9* és *CYP3A4* enzimeknél is, azaz az intermedier metabolizáló csoportot a medián értéknél kétfelé osztottuk. Bár farmakogenetikai értelemben ultra-gyors metabolizálókról nem beszélünk a *CYP1A2*, *CYP2C9* és *CYP3A4* enzimeknél, a három kvartilist véve határértéknek négy kategóriát, gyenge, alacsony intermedier, magas intermedier és normál (extenzív) metabolizáló csoportokat hoztunk létre (D14-15, D16). A 16. ábra példaként bemutatja a humán májszövet minták *CYP2D6* és *CYP1A2* enzimaktivitás eloszlását.



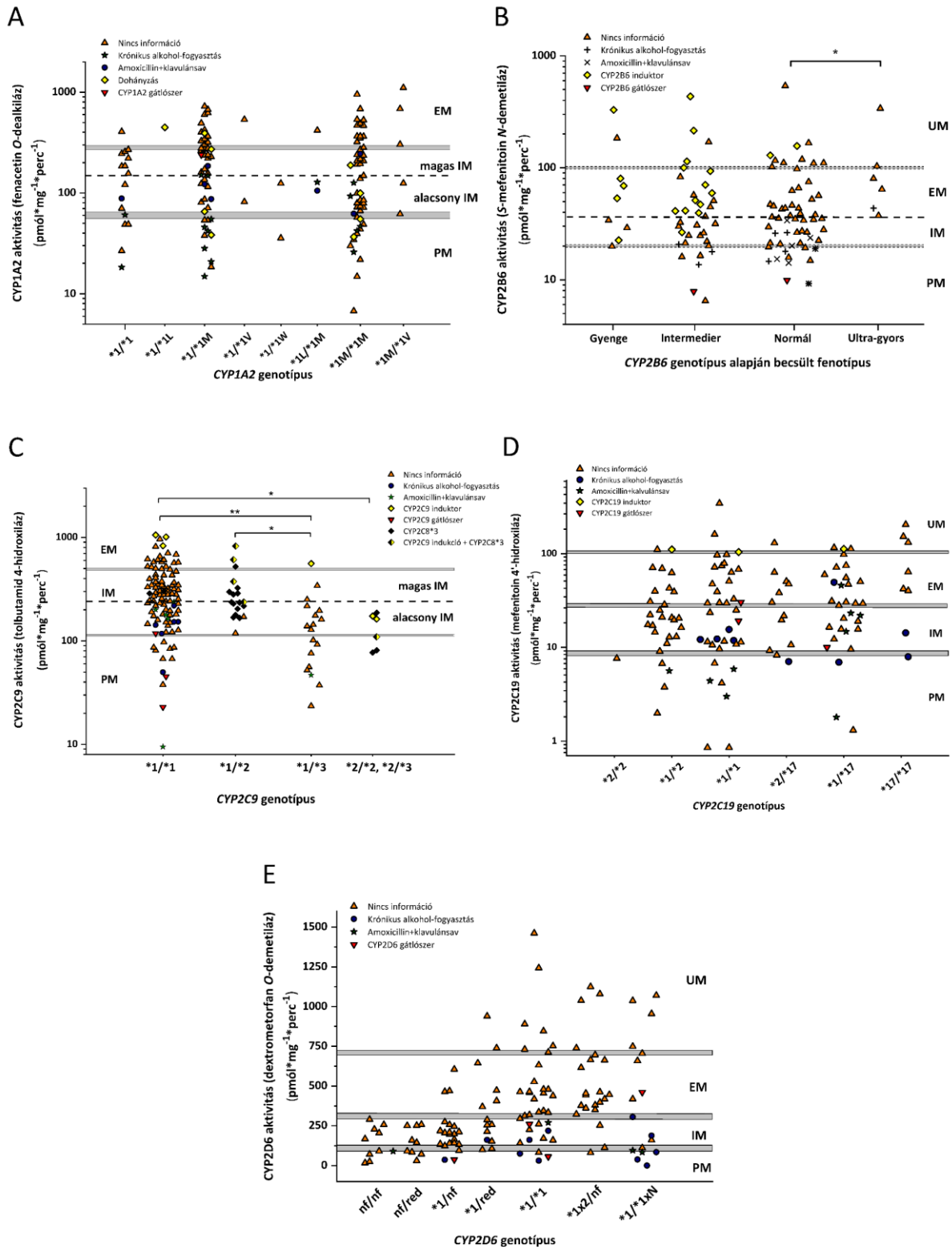
16. ábra: Humán májszövet minták **CYP2D6** és **CYP1A2** aktivitása: A) a *CYP2D6* aktivitás (dextrometorfan *O*-demetiláz) eloszlása; B) a *CYP1A2* aktivitás (fenacetin *O*-dealkiláz) eloszlása. A függőleges vonal a mediánt, az alacsony és magas intermedier metabolizálók közti határértéket jelzi.

Felmerült a kérdés, hogy 1) a gyógyszer-metabolizmus eltéréseit eredményező *CYP* genetikai variabilitás és a nem-genetikai tényezőknek köszönhető fenokonverzió egyformán érvényesül-e az egyes *CYP* enzimeknél; 2) az ismert *CYP*-szelektív nem-genetikai tényezőkön (*CYP* enzim gátlószerek, *CYP* induktor vegyületek) kívül milyen egyéb faktorok okozhatnak módosulást az enzimaktivásban. *CYP* genotípus szerint is értékeltük a humán májszövet mintákat, amelyhez a CPIC ajánlásait vettük irányadónak; általánosságban 1) a két funkció-vesztő allélt hordozó donort gyenge metabolizálónak, 2) az egy vad-típusú (\*1) allélt és egy funkció-vesztő allélt hordozót intermedier metabolizálónak, 3) két vad-típusú allél esetén normál metabolizálónak, 4) míg a vad-

típusú allélt kettőnél több kópiában hordozókat, vagy egy vad-típusú allélt és egy funkció-fokozó allélt hordozót ultra-gyors metabolizálónak tekintettük (részletek: Függelék 12.6). A *CYP* genotípust, illetve a *CYP* genotípusok alapján becsült fenotípust összevetettük a májszövet minták *CYP*-szelektív aktivitásaival és mRNS expressziójával (17. ábra).

A *CYP1A2* genetikai variabilitás hatása a *CYP1A2* mRNS expresszióra és enzimaktivitásra (fenacetin *O*-dealkiláz) meglehetősen ellentmondásos az irodalomban. Már a *CYP1A2* allélok azonosítása, a különböző etnikai populációkban való előfordulási gyakoriság megállapítása és a genotípus alapján történő fenotípus becslés is számos bizonytalanságot hordoz. A -163C>A SNP (rs762551) alapján azonosított *CYP1A2\*1F* allélt, amelyet fokozott indukálhatósággal hoznak összefüggésbe, a leggyakoribb allélvariánsnak tartják (32-57% előfordulási gyakoriság), míg a *CYP1A2\*1C*, *CYP1A2\*1D* és *CYP1A2\*1E* allélok az adatok szerint alacsonyabb gyakorisággal (0,4-11%) vannak jelen a kaukázusi populációban (Sachse 1999 és 2003; Zanger 2013; Perera 2012). A humán májszövet mintáinkban (N=151) (illetve a pszichiátriai betegeknél, N=274) azonosított *CYP1A2* allélvariánsok gyakorisága igencsak eltért az irodalomban fellelhető adatoktól (**D11**). Nem mutattuk ki sem a *CYP1A2\*1C*, *CYP1A2\*1D*, sem a *CYP1A2\*1E* allélokot, míg a *CYP1A2\*1F* allélt a májszövet mintákban nem, csak a pszichiátriai betegeknél azonosítottuk 0,4%-ban. Az eltérés azzal magyarázható, hogy a *CYP1A2\*1C*, *CYP1A2\*1D*, *CYP1A2\*1E* és *CYP1A2\*1F* allélokban lévő SNP-k más SNP-kkel kapcsolatosan több *CYP1A2* haplotípusban is előfordulnak (Függelék 12.1), így számos korábbi publikációban a *CYP1A2* allélvariáns azonosítás feltehetőleg hiányos allél-definíció alapján történt. A májszövet mintáinkban a leggyakoribb allél a *CYP1A2\*1M* volt (kb. 60%), amely azonban nem volt kihatással a *CYP1A2*-szelektív fenacetin *O*-dealkiláz aktivitásra. A -2467delT (rs35694136) SNP-t és a *CYP1A2\*1V* allélvariánst viszont emelkedett *CYP1A2* aktivitással hoztuk összefüggésbe (4. táblázat, 17.A ábra), amely együtt járt a *CYP1A2* expresszió fokozódásával is. Ugyanakkor a -163C>A polimorfizmus és az enzimaktivitás vagy a *CYP1A2* expresszió között nem volt kimutatható szignifikáns összefüggés.

A májszövet mintákban (N=119) a *CYP2B6* allélvariánsok közül mindössze a *CYP2B6\*6* allél mutatott összefüggést a csökkent *CYP2B6* expresszióval, amely a 15631G>T (rs3745274) SNP *CYP2B6* expressziót és enzimaktivitást (*S*-mefenitoin *N*-demetiláz) csökkentő hatásával magyarázható (4. táblázat), a 15631G>T okozta hibás intron kivágódás (hibás „splicing”) ugyanis a 4-6 exonok hiányát és *CYP2B6* enzimaktivitás redukciót eredményez (**D12**). Bár a 18053A>G (rs2279343) SNP okozta *CYP2B6* expresszió növekedést kimutattuk, a *CYP2B6\*4* allél *CYP2B6* aktivitást és expressziót fokozó hatása csak a *CYP2B6\*1/\*4* genotípusú mintákban volt tetten érhető (4. táblázat, 17.B ábra ultra-gyors metabolizálók).



17. ábra: A *CYP* genetikai variabilitás és a nem-genetikai tényezők (*CYP* gátlás és indukció; krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin+klavulánsav terápia) hatása a *CYP1A2* (A), *CYP2B6* (B), *CYP2C9* (C), *CYP2C19* (D) és *CYP2D6* (E) enzimaktivitásokra. A tekintélyes számú genotípus variáció miatt a *CYP2B6* illetve a *CYP2D6* aktivitások genotípus összefüggéseit a PharmVar és a CPIC ajánlásai alapján értékeltük (Függelék 12.1 és 12.6). PM gyenge, IM intermediér, EM normál, UM ultra-gyors metabolizáló fenotípus; *nf* nem működő, *red* csökkent működőképességű enzimet kódoló allél, *xN* *CYP* gén multiplikáció; \**P*<0,05, \*\**P*<0,001

A *CYP2C9* genetikai variabilitás sokkal egyértelműbb képet eredményezett a *CYP2C9* aktivitásokban (17.C ábra), azonban az expresszióra semmilyen kihatással nem volt (N=164) (4. táblázat) (**D13**). A *CYP2C9*\*3 allél, amely a 42614A>C mutáció (rs1057910) miatt bekövetkező Ile359Leu aminosav cseréhez vezet, szignifikánsan csökkentette a *CYP2C9*-szelektív tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitást, míg a *CYP2C9*\*2 allél hatása csak a két polimorf allélt (*CYP2C9*\*2/\*2 és *CYP2C9*\*2/\*3) hordozó májszövet mintákban jelent meg (17.C ábra, 4. táblázat). Mivel a *CYP2C9*\*2-ben található 3608C>T bázis-csere (rs1799853) kapcsolatosan jelenik meg a *CYP2C8*\*3-ban lévő 2130G>A (rs11572080) SNP-vel (Yasar 2002), kézenfekvő volt a *CYP2C8*\*3 és a tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitás közti összefüggés értékelése. Bár a *CYP2C9* 3608C>T (rs1799853) és a *CYP2C8* 2130G>A (rs11572080) kapcsoltságát kimutattuk (a kapcsoltságot jelző  $D'$  0,87; a valószínűséget jelző LOD 18,8), a *CYP2C8*\*3 allél egyáltalán nem befolyásolta a tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitását (részletek a **D13** publikációban).

A májszövet mintákban (N=114) a *CYP2C19* allélvariánsok közül csak a null-aktivitást eredményező *CYP2C19*\*2-t és a fokozott expresszióhoz vezető *CYP2C19*\*17-t azonosítottuk (17.D ábra) (**D14**, **D15**). A multivariancia analízis azonban csak a *CYP2C19*\*17/\*17 genotípusú májszövet mintákban jelzett szignifikáns *CYP2C19* expresszió és *CYP2C19*-szelektív *S*-mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitás növekedést (4. táblázat).

A *CYP2D6* genetikai polimorfizmusra visszavezethető dextrometorfan *O*-demetiláz aktivitás változások értékeléséhez (N=128) a nagyszámú allélvariáns miatt a CPIC által javasolt besorolás szerint funkció-vesztő (nf: *CYP2D6*\*3, *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*5, *CYP2D6*\*6), funkció-csökkentő (red: *CYP2D6*\*10, *CYP2D6*\*41) és funkció-fokozó (duplikáció/multiplikáció: xN) allélvariáns csoportokat hoztunk létre (**D16**). A *CYP2D6*nf/nf, *CYP2D6*nf/red és *CYP2D6*\*1/nf genotípus szignifikáns *CYP2D6* aktivitás csökkenést okozott, míg a *CYP2D6*\*1 multiplikációja, a vad-típusú allél legalább 3 kópiában való előfordulása a *CYP2D6*-szelektív enzimaktivitás növekedését eredményezte (17.E ábra, 4. táblázat).

A CYP fenotípus becslésekor a *CYP* genotípus mellett érdemes figyelemmel lenni a CYP aktivitást és/vagy expressziót módosító nem-genetikai tényezőkre is. Szem előtt kell azonban tartani, hogy a fenokonverzió eredménye genotípus függő lehet. Ugyanis egy CYP gátlószer egy genotípusosan normál (pl. *CYP2D6*\*1/\*1) vagy intermedier metabolizálóból (pl. *CYP2D6*\*1/\*4) gyenge metabolizáló fenotípust idézhet elő, míg a genotípusosan gyenge metabolizáló (pl. *CYP2D6*\*4/\*4) null aktivitását nem befolyásolja a gátlószer. Érdemes végiggondolni egy csökkent enzimaktivitást eredményező *CYP* variáns indukcióját is. Például egy *CYP2C9*\*2/\*2 genotípusú, gyenge metabolizálónak minősített személynél induktor vegyület hatására fokozódhat a *CYP2C9* gén

4. táblázat: A CYP aktivitást és expressziót befolyásoló genetikai és nem-genetikai tényezők humán májszövet mintákban (multivariancia analízis)

	CYP1A2		CYP2B6		CYP2C9		CYP2C19		CYP2D6
	aktivitás	expresszió	aktivitás	expresszió	aktivitás	expresszió	aktivitás	expresszió	aktivitás
<b>Genetikai tényezők</b>									
SNP	↑-2467delT (rs35694136)	↑-2467delT (rs35694136)	↓15631G>T (rs3745274)	↓15631G>T (rs3745274) ↑18053A>G (rs2279343)	↓42614A>G (rs1057910)	ns	ns	ns	↓1847G>A (rs3892097)
CYP allél	↑CYP1A2*1V	↑CYP1A2*1V ↑CYP1A2*1L	ns	↓CYP2B6*6	↓CYP2C9*3	ns	ns	ns	↓CYP2D6*4 ↑xN <sup>e</sup>
CYP genotípus	↑*1M/*1V	↑*1M/*1V ↑*1/*1L	↑*1/*4	↑*1/*4	↓*1/*3 ↓*2/*2 ↓*2/*3	ns	↑*17/*17	↑*17/*17	↓nf/nf <sup>f</sup> ↓nf/red <sup>g</sup> ↓*1/nf
<b>Nem-genetikai tényezők</b>									
Életkor (>50 év)	↓	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Nem	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CYP induktor	na	na	↑ <sup>a</sup>	↑ <sup>a</sup>	↑ <sup>b</sup>	↑ <sup>b</sup>	↑ <sup>c</sup>	↑ <sup>c</sup>	na
CYP gátlószer	na	na	na	na	↓ <sup>d</sup>	na	ns	na	ns
Amoxicillin +klavulánsav terápia	ns	↓	ns	ns	↓	↓	ns	ns	ns
Krónikus alkohol- fogyasztás	↓	↓	ns	ns	↓	↓	↓	↓	↓

<sup>a</sup>dexametazon, metilprednizolon, prednizolon, hidrokortizon, kortizon, midazolam, felodipin, diazepam; <sup>b</sup>dexametazon, metilprednizolon; <sup>c</sup>dexametazon, metilprednizolon, kortizon; <sup>d</sup>amlodipin, tamoxifen; <sup>e</sup>CYP2D6\*1 multiplikáció; <sup>f</sup>nf: CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, CYP2D6\*5, CYP2D6\*6; <sup>g</sup>red: CYP2D6\*10, CYP2D6\*41; na: nem értékelt; ns: nem szignifikáns

expressziója, a genotípusosan csökkent aktivitású enzim mennyisége megnőhet, ami intermedier metabolizáló fenotípust eredményezhet.

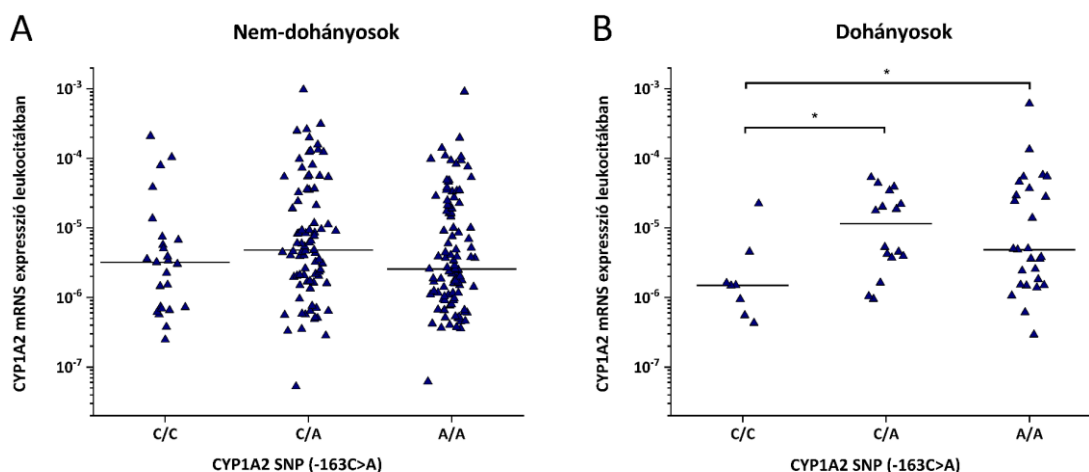
A májszövet donorok demográfiai és klinikai adatai között olyan CYP-szelektív (CYP-gátló, illetve indukáló hatású gyógyszeres terápia) és nem-szelektív faktorokat (életkor, nem, egyéb gyógyszeres kezelés, krónikus alkoholfogyasztás) kerestünk, amelyek vélhetően befolyásolhatták a CYP fenotípust (17. ábra, 4. táblázat). A donorok neme és életkora nem mutatott összefüggést sem a CYP enzimaktivitásokkal, sem a CYP expresszióval egyetlen kivételtől eltekintve. A CYP1A2-szelektív fenacetin *O*-dealkiláz aktivitás az életkor előrehaladtával csökkent, azonban a CYP1A2 mRNS expressziót nem befolyásolta az életkor (D11). Meg kell jegyezni, hogy a donorok életkora 18 év vagy annál magasabb volt, így a gyermek- és fiatal felnőttkorban bekövetkező CYP aktivitás-változásokat nem tudtuk tetten érni. A gyógyszeres terápiák közül szignifikáns aktivitás (tolbutamid 4-hidroxiláz) csökkenést eredményezett a CYP2C9-szelektív gátlószerekkel (amlodipin, tamoxifen) történő kezelés (D13), míg egyéb ismert CYP gátlószerek hatása nem volt értékelhető. A CYP-szelektív induktor hatóanyagok (pl. dexametazon, metilprednizolon, prednizolon, hidrokortizon, kortizon, midazolam, felodipin, diazepam) jelentősen hozzájárultak a CYP2B6, CYP2C9 és CYP2C19 enzimaktivitás és expresszió fokozódásához (D12-14). A nem CYP-szelektív amoxicillin+klavulánsav kezelés szignifikánsan csökkentette a CYP1A2 és CYP2C9 mRNS expresszióját, illetve a CYP2C9 aktivitását (D11, D13). Hasonlóan a krónikus alkoholfogyasztás negatívan befolyásolta számos CYP enzim aktivitását és expresszióját (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6) (D11, D13, D14, D16).

5. táblázat: A CYP genotípus alapján történő fenotípus (CYP aktivitás) becslés és a nem-genetikai tényezők okozta fenokonverzió értékelése humán májszövet mintákban.

	CYP fenotípust (enzimaktivitás) befolyásoló tényezők azonosítása*		Genotípus – fenotípus „mismatch”
	CYP genotípus	Nem-genetikai tényezők okozta fenokonverzió	
<b>CYP1A2</b>	?	25%	?
<b>CYP2B6</b>	28%	34%	38%
<b>CYP2C9</b>	53%	15%	32%
<b>CYP2C19</b>	40%	21%	39%
<b>CYP2D6</b>	67%	18%	15%

\*genetikai vagy nem-genetikai tényezőkkel magyarázható CYP aktivitás gyakorisága májszövet mintákban

Összegezve megállapíthatjuk, hogy a genetikai és nem-genetikai fenokonverziós tényezők hatása eltérő arányban jelentkezett a májszövet donorok CYP fenotípusában (CYP aktivitásában) (5. táblázat). A genetikai polimorfizmus alapján a legnagyobb arányban (a májszövet minták több mint 2/3-ánál) a CYP2D6 aktivitás becsülhető volt (D16), míg a CYP2B6 aktivitást a májszövet minták alig több 1/4-énél támasztotta alá a genetikai háttér (D12). A nem-genetikai tényezőknek köszönhető fenokonverzió a májszövet minták 15-34%-ánál magyarázta a megváltozott CYP aktivitást. A szövet minták 15-39%-ánál azonban nem találtunk olyan nem-genetikai faktorokat, amelyek alátámasztották volna a genotípus alapján becsült CYP fenotípustól való eltérést (genotípus-fenotípus „mismatch”). Indokolt felvetni annak lehetőségét, hogy a CYP polimorfizmus meghatározás során nem azonosítottuk az összes, CYP aktivitást módosító genetikai tényezőt, vagy nem volt információnk minden olyan nem-genetikai tényezőről, ami befolyásolhatta a CYP fenotípust. Jó példa ez utóbbira a dohányzás CYP1A2 expressziót indukáló hatásának értékelése (D11).



18. ábra: A **dohányzás és a CYP1A2 -163C>A SNP hatása** a CYP1A2 expresszióra pszichiátriai betegeknél. A betegek CYP1A2 fenotípusát a máj CYP1A2 aktivitását tükröző leukocita CYP1A2 mRNS expresszióval jellemeztük. A vízszintes vonalak a mediánt jelzik. \*  $P < 0,05$

A májszövet donorok dohányzási aktivitásáról hiányos információk álltak rendelkezésre, ezért kiegészítő vizsgálatként pszichiátriai betegeknél értékeltük a dohányzás hatását a CYP1A2 expresszióra (D11). Mivel a perifériás vérből izolálható leukociták CYP1A2 expressziója tükrözi a máj CYP1A2 enzimaktivitását (ld. 4.3.1, D20), a CYP1A2 mRNS expressziót a betegek leukocitáiban határoztuk meg. Azonban a pontos dohányzási szokások ismeretében sem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni a dohányos és nem-dohányos betegek CYP1A2 mRNS expressziója között. Viszont a CYP1A2 polimorfizmus, különös tekintettel a -163C>A (rs762551) SNP-re és a dohányzás együttes hatását vizsgálva megállapíthatjuk, hogy dohányosok között a vad-típusú -163C/C-t hordozó betegekhez képest szignifikánsan magasabb CYP1A2 expresszió

volt tapasztalható a -163C/A és -163A/A-t hordozó betegeknél (18 ábra). Ugyanakkor hasonló összefüggést nem találtunk a nem-dohányosoknál. Mindez azt is jelentette, hogy a fokozott CYP1A2 expresszió nem kizárólag a *CYP1A2\*1F* allélt hordozó dohányos betegekre, de minden olyan dohányosra igaz, akik -163A-t hordoznak heterozigóta vagy homozigóta formában (pl. *CYP1A2\*1L*, *CYP1A2\*1M*, *CYP1A2\*1V*, *CYP1A2\*1W* allélt hordozó dohányosokra).

#### 4.2.2 A dexametazon és a dehidroepiandroszteron hatása a CYP enzimekre (D17-19)

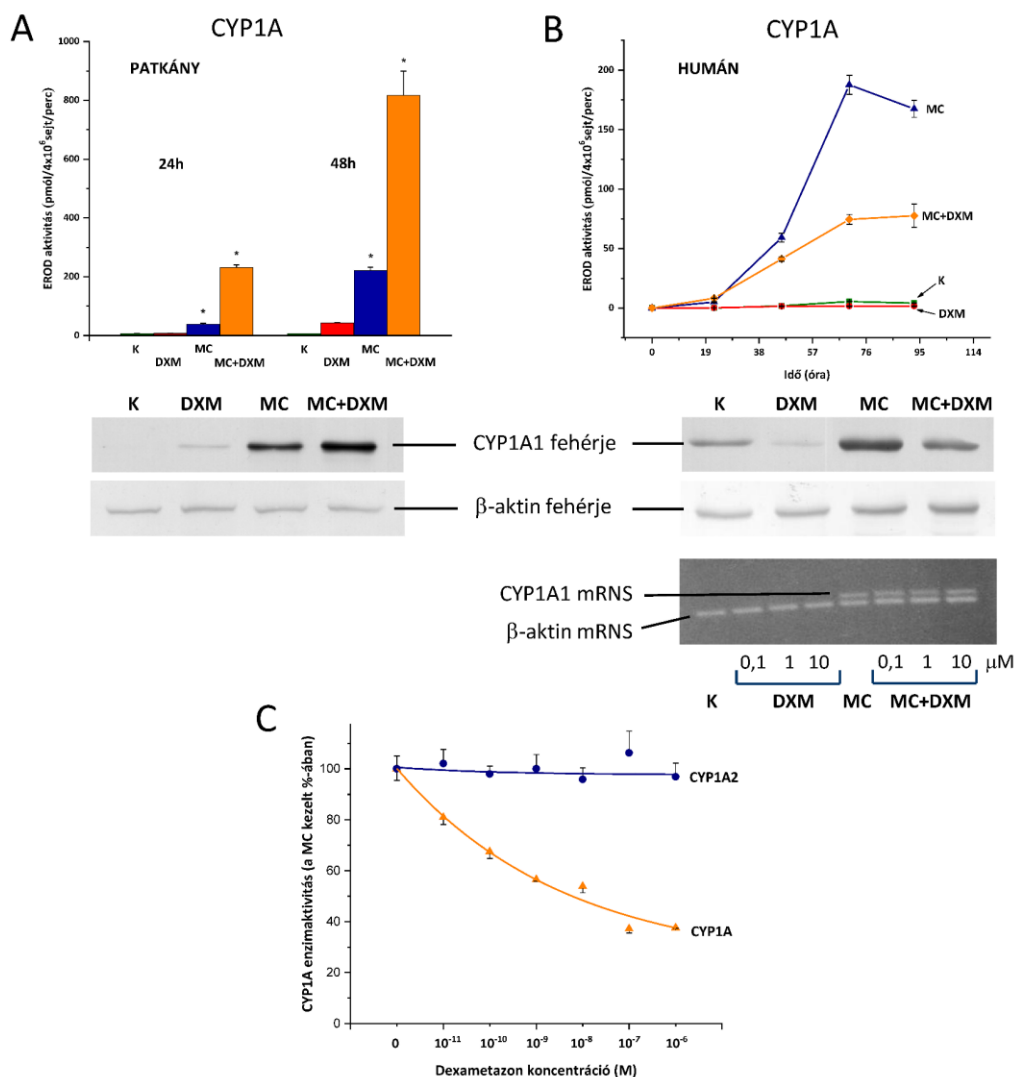
Számos endogén és szintetikus szteroidról (pl. ösztradiol, tesztoszteron, progeszteron, pregnenolon, dexametazon) ismert, hogy befolyásolják a CYP enzimek aktivitását (Pelkonen 2008; Hakkola 2020; S10). A 4.2.1 fejezetben is történt utalás arra, hogy szteroid típusú hatóanyagok indukálták egyes CYP enzimek expresszióját és aktivitás emelkedéshez vezettek (4. táblázat). Két szteroid vegyület, a dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP expressziót és ezáltal a gyógyszer-metabolizmust módosító hatását, valamint a lehetséges hatásmechanizmusokat tanulmányoztuk *in vitro* sejtes rendszerekben (D17-19). A dexametazon egy gyulladáscsökkentő hatású szintetikus glukokortikoid, amelyet asztma, súlyosabb bőrbetegségek, autoimmun kórképek, műtét utáni gyulladáscsökkentő állapotok kezelésére, illetve daganatos betegek palliatív terápiájában alkalmaznak. A dehidroepiandroszteron a mellékvesekéregben termelődő hormon prekursor, amely azonban étrend-kiegészítőként interneten keresztül is elérhető. A két vegyület szerkezetében (6. táblázat) és farmakológiai/élettani hatásában ugyan több ponton is különbözik egymástól, mégis az egyes CYP enzimek expresszióját és aktivitását módosító hatásukat érdemes összevetni.

##### 4.2.2.1 Eltérések a dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP1A enzimek indukciójára gyakorolt hatásában (D17, D18)

A *CYP1A* gének expressziója komplex szabályzás alatt áll, amelynek meghatározó eleme a policiklusos aromás szénhidrogének okozta AhR aktiváció és CYP1A indukció (ld. 1.5.2 fejezet). A CYP1A indukciót azonban szteroid hormonok módosíthatják. Ismert, hogy patkány májban a glukokortikoidok fiziológiás koncentrációban potenciózzák az AhR-függő CYP1A1 expressziót, amely nem meglepő annak ismeretében, hogy a *CYP1A1* gén 1. intronja három glukokortikoid érzékeny szakaszt (GRE) tartalmaz (Sherratt 1990; Xiao 1995).

Patkány primer hepatocitákban a **dexametazon** ugyan önmagában nem, vagy csak kevésbé befolyásolta a *CYP1A1* transzkripcióját, poliaromás szénhidrogének (AhR aktivátorok), mint a 3-metilkolantrén jelenlétében azonban szinergista hatást fejtett ki és az aktivált GR-on (glukokortikoid receptoron) keresztül fokozta a CYP1A1 expresszióját és aktivitását (19.A ábra).





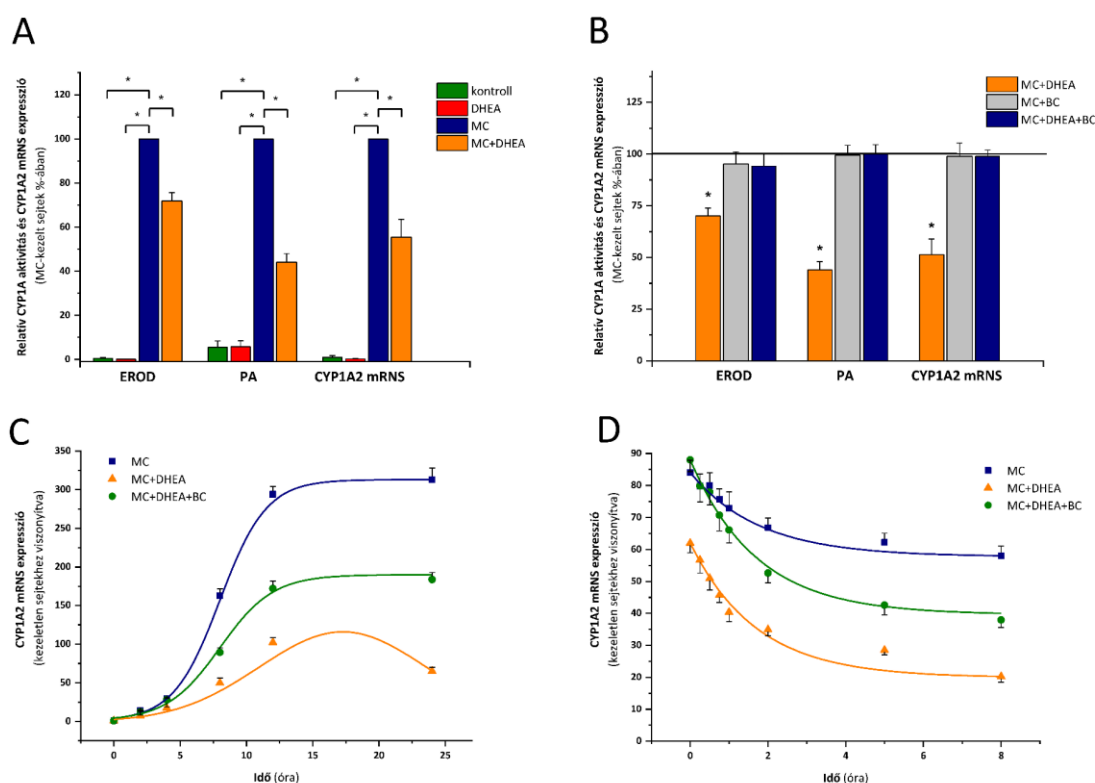
19. ábra: A **dexametazon** (DXM) hatása CYP1A1 indukcióra.

A) **Patkány** májsejtekben a 3-metilkolantrén (MC) okozta CYP1A1 indukciót (7-etoxiresorufin *O*-dealkiláz aktivitás [EROD] és CYP1A1 enzimfehérje expresszió emelkedést) a DXM (10 μM) potenciózta (\*a kontroll [K] sejtekhez viszonyítva,  $P < 0,05$ ) (3 független vizsgálat); B) míg **humán** májsejtekben szignifikánsan mérsékelte úgy, hogy a CYP1A1 mRNS expressziót nem befolyásolta (6 független vizsgálat). C) A DXM a MC által kiváltott CYP1A1 indukciót (EROD) koncentráció-függő módon mérsékelte, azonban a CYP1A2 enzimaktivitásra (fenacetin *O*-dealkiláz) nem volt hatással. A fehérje expresszió (A és B) és a mRNS expresszió (B) vizsgálatokban a β-aktint használtuk referenciaként.

Az már sokkal meglepőbb volt, hogy humán májsejtekben a 3-metilkolantrén által kiváltott CYP1A1 enzimfehérje expressziót és CYP1A aktivitást (7-etoxiresorufin *O*-dealkiláz) a dexametazon koncentráció-függő módon csökkentette úgy, hogy a CYP1A1 mRNS expressziót nem befolyásolta; azaz poszt-transzkripció útján (pl. csökkent CYP1A1 fehérje szintézissel vagy fokozott CYP1A1 fehérje degradációval) módosította a CYP1A1 indukciót (19.B ábra) (D17). Kimutattuk továbbá, hogy a dexametazon okozta CYP1A1 indukció csökkenéséhez nem volt szükség GR-ra. A jelenség ugyanakkor nem volt megfigyelhető a CYP1A alcsalád másik tagjánál,

a 3-metilkolantrén okozta CYP1A2 indukciót (fenacetin *O*-dealkiláz aktivitás) a dexametazon nem módosította humán májsejtekben (19.C ábra).

A **dehidroepiandroszteron** humán májsejtekben, a dexametazonhoz hasonlóan, csökkentette a 3-metilkolantrén indukálta CYP1A aktivitást (7-etoxiresorufin *O*-dealkiláz), azonban ez a csökkenés nem annyira a CYP1A1, sokkal inkább a CYP1A2 enzimaktivitás (fenacetin *O*-dealkiláz) változásának volt tulajdonítható (20.A ábra) (**D18**). Miként a dexametazon humán májsejtekben, a dehidroepiandroszteron is érintetlenül hagyta a *CYP1A1* transzkripciót, sőt a *CYP1B1* gén átíródását sem befolyásolta, azonban a CYP1A2 mRNS expressziót szignifikánsan

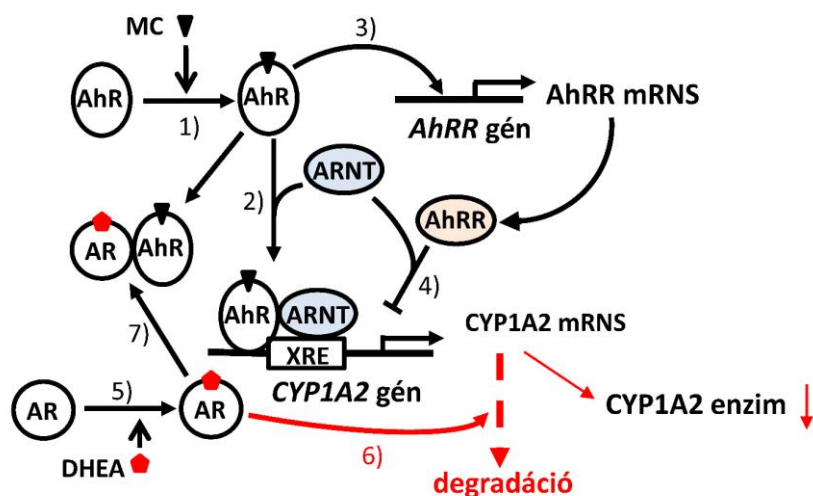


20. ábra: A **dehidroepiandroszteron** (DHEA) CYP1A2 indukciót módosító hatása.

A) **Humán májsejtekben** a 3-metilkolantrénnel (MC) kiváltott CYP1A2 indukció során megemelkedő 7-etoxiresorufin *O*-dealkiláz (EROD, CYP1A) és fenacetin *O*-dealkiláz (PA, CYP1A2) enzimaktivitásokat, valamint a CYP1A2 mRNS expressziót a DHEA szignifikánsan mérsékelte (\*  $P < 0,001$ ), B) az androgén receptor antagonistá bicalutamid (BC) pedig felfüggesztette a DHEA hatását (\*  $P < 0,001$ ). C) Androgén receptort kifejező **LNCaP sejtvonalban** a MC, MC+DHEA és MC+DHEA+BC kezelésekre eltéréseket tapasztaltunk a CYP1A2 indukció (CYP1A2 mRNS expresszió) kialakulásában, D) és az indukciós kezelés után 4 órával aktinomycin D-vel leállított transzkripciót követően a CYP1A2 mRNS degradációjában.

csökkentette (20.A ábra). Mivel több hormon receptorról is ismert, hogy aktivált állapotban módosítják a CYP1A1 indukciót (**S13**), logikus volt a kérdés, hogy a dehidroepiandroszteron CYP1A2 indukciót mérséklő hatásához szükség van-e valamelyik receptorra, vagy közvetlenül

okoz CYP1A2 expresszió csökkenést. Glukokortikoid, ösztrogén és androgén receptor antagonistákat (RU-486, ICI-164,384, bikalutamid) alkalmazva megállapítottuk, hogy egyedül a bikalutamid volt képes felfüggeszteni a dehidroepiandrosteron okozta CYP1A2 indukció módosulást (20.B ábra), ami az androgén receptor szerepét hangsúlyozta a CYP1A2 indukálhatóság megváltozásában. Androgén receptort expresszáló humán daganatos sejtvonalakban (MCF-7 emlő és LNCaP prosztata daganatos sejtvonalak) tanulmányoztuk a CYP1A2 indukciót, valamint a transzkripció blokkolása (aktinomicin D-vel) után bekövetkező CYP1A2 mRNS degradációt (20.C és D ábra, az LNCaP sejtvonalban kapott eredmények). A 3-metilkolantrén és dehidroepiandrosteron (MC és MC+DHEA) jelenlétében kialakuló CYP1A2



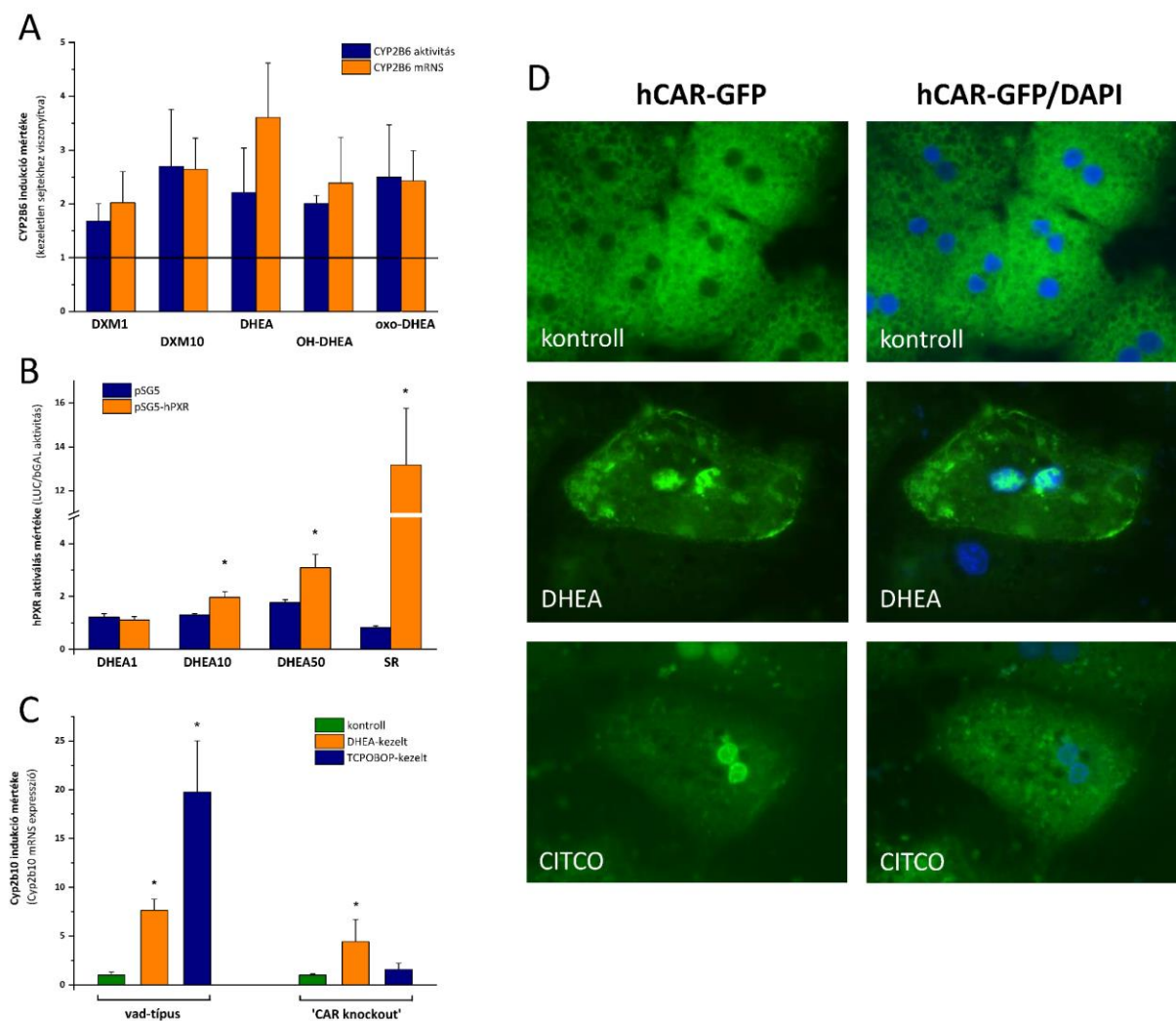
21. ábra: Az androgén receptor és a **dehidroepiandrosteron** (DHEA) szerepe a **CYP1A2 indukció** szabályzásában. 1) Az aromás szénhidrogének (pl. 3-metilkolantrén, MC) aktiválják az aromás szénhidrogén receptort (AhR). 2) Az aktivált AhR a sejtmagban heterodimert képez az AhR nukleáris transzlokátorral (ARNT), amely a *CYP1A2* gén xenobiotikum érzékeny szakaszához (XRE) kötődik és a *CYP1A2* átíródását fokozza. 3) Az AhR egyben az AhR represszor (AhRR) átíródását is elindítja. 4) az AhRR fehérje az ARNT-al dimerizálódva leállítja a *CYP1A2* gén további átíródását. 5) A DHEA az androgén receptort (AR) aktiválja és 6) fokozza a CYP1A2 mRNS degradációját, ami csökkent CYP1A2 enzim szintézishez vezet. 7) Az aktivált AR az AhR működését is gátolja. Saját eredmények pirossal jelezve.

indukció és a CYP1A2 mRNS degradáció kinetikai modellje alapján megállapítottuk, hogy a dehidroepiandrosteron okozta CYP1A2 indukció csökkenés elsősorban poszt-transzkripciós mechanizmusnak köszönhető, amely az androgén receptor antagonistákkal (MC+DHEA+BC) felfüggeszthető volt [MCF-7 sejtekben kalkulált degradációs konstans ( $k_d$ ) értékek: MC 0,30 óra<sup>-1</sup>, MC+DHEA 0,95 óra<sup>-1</sup>, P<0001; LNCaP sejtekben: MC 0,50 óra<sup>-1</sup>, MC+DHEA 0,68 óra<sup>-1</sup>, MC+DHEA+BC 0,49 óra<sup>-1</sup>, P<0,05]. Ezzel megerősítettük, hogy a dehidroepiandrosteronnal kiváltott CYP1A2 indukció mérséklésében az androgén receptornak meghatározó szerepe van, amellyel kiegészíthettük a CYP1A2 indukció mechanizmusáról és módosulásáról kialakított képet (21. ábra, részletek az ábra aláírásban). Mindez egyben

magyarázatul szolgálhat a dehidroepiandroszteron ismert jótékony, kemopreventív hatására is, amely a CYP1A2 indukálhatóság visszaszorításával a prekarcinogén anyagok metabolikus aktiválását is csökkenti (Rao 1999; Prough 2016; Klinge 2018).

#### 4.2.2.2 Hasonlóságok a dexametazon és a dehidroepiandroszteron CYP2 és CYP3 enzimek expressziójára és aktivitására gyakorolt hatásában (D19)

A glukokortikoidok, különösen a szintetikus glukokortikoid dexametazon CYP-indukáló hatása jól ismert (Pascussi 2008; Hukkanen 2012; S10). A dexametazon a GR és a PXR nukleáris receptorok aktiválásával szignifikánsan növeli a gyógyszer-metabolizmusban meghatározó CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek transzkripcióját, ami fokozott enzimaktivitáshoz vezet. Így a dexametazont referencia vegyületként használhattuk a dehidroepiandroszteron CYP-indukáló képességének tanulmányozása során humán májsejtekben (22.A ábra). Russell Prough és kutatócsoportja (University of Louisville School of Medicine) patkányokon és egereken végzett *in vivo* vizsgálatokban megállapította, hogy a dehidroepiandroszteron a PXR bevonásával indukálta a patkány CYP3A23, illetve az egér CYP3A11 enzimek transzkripcióját, valamint negatívan befolyásolta a CYP2C11 expresszióját (Singleton 1999; Ripp 2002 és 2003). Kutatócsoportunk humán májsejteken igazolta, hogy a dehidroepiandroszteron nemcsak a humán ortológ *CYP3A4*, de a *CYP2B6*, *CYP2C9* és *CYP2C19* gének átíródását és az enzimek aktivitását is fokozta, méghozzá a dexametazonhoz hasonló mértékben (22.A ábra a CYP2B6 indukcióját szemlélteti) (D19). Sőt a dehidroepiandroszteron oxidatív metabolizmusa során képződő 7 $\alpha$ -hidroxi-dehidroepiandroszteron és 7-oxo-dehidroepiandroszteron metabolitok az anyavegyülethez hasonló CYP indukációs képet mutattak, azaz a dehidroepiandroszteron metabolizmusa nem szüntette meg a CYP-indukáló képességet. A dehidroepiandroszteron kezeléssel humán hepatocitákban előidézett CYP3A4 indukáció összhangban volt a rágsálókon kapott eredményekkel, azonban a megemelkedett *CYP2B6*, *CYP2C9* és *CYP2C19* transzkripció váratlan eredmény volt. A humán PXR-t a dehidroepiandroszteron koncentráció-függő módon aktiválta (22.B ábra), amely részben megmagyarázta a CYP enzimek indukcióját. A dehidroepiandroszteron androgén volta azonban a CAR-aktiváló képesség tisztázását is megkívánta. Olyan egerekből izolált májsejteken tanulmányoztuk a dehidroepiandroszteron okozta *Cyp2b10* (egér CYP2B ortológ) indukciót, amelyekből génkiütés miatt hiányzott a CAR („CAR knockout” egerek). Megállapíthattuk, hogy CAR hiányos egér májsejtekben a dehidroepiandroszteron ugyan csökkent mértékben indukálta a *Cyp2b10* gén átíródását, a maximális *Cyp2b10* indukációhoz azonban szükség volt a CAR-ra (22.C ábra). További bizonyítékot jelentett a CAR szerepére a dehidroepiandroszteron okozta CYP transzkripció fokozódásában, hogy a *Cyp2b10* indukciót az inverz CAR agonista androsztanol



22. ábra: A **dehidroepiandrosteron (DHEA)** okozta **CYP2B6 indukció** humán májsejtekben és az indukcióban szerepet játszó nukleáris receptorok azonosítása.

A) A DHEA és két metabolitja, a  $7\alpha$ -hidroxi-DHEA (OH-DHEA) és a 7-oxo-DHEA (oxo-DHEA) indukálta a CYP2B6 mRNS expressziót és a CYP2B6 enzimaktivitást (*S*-mefenitoin *N*-demetiláz) humán májsejtekben a dexametazonhoz (DXM 1 és 10  $\mu$ M) hasonló mértékben (6 független vizsgálat). B) A DHEA koncentráció függően aktiválta a humán PXR-t HuH7 sejtekben (a sejteket pSG5 vagy pSG5-hPXR plazmiddal, pGL3-CYP3A4/XREM-LUC riporter plazmiddal és pSV- $\beta$ -galaktozidáz referencia plazmiddal transzfektáltuk) (referencia hPXR agonista: SR-12813). C) A DHEA indukálta az egér ortológ *Cyp2b10* expressziót vad-típusú és CAR hiányos („CAR knockout”) egér májsejtekben is (referencia CAR-szelektív aktivátor: TCPOBOP). D) A DHEA aktiválta a humán CAR-t egér májsejtekben (az egér sejteket GFP-hCAR-al transzfektáltuk, a sejtmag festés DAPI-val történt) (referencia hCAR aktivátor: CITCO). SR SR-12813, GFP „green-fluorescent protein”, DAPI 4'-6-diamidin-2-fenilindol, \* $P < 0,05$

szignifikánsan gátolta (részletek a **D19** publikációban). Másrészt a humán CAR-t kifejező (hCAR transzfektált) egér májsejtekben dehidroepiandrosteron hatására a CAR látható módon a citoplazmából a sejtmagba vándorolt, amely a *CYP2B6* indukció első lépése. A dexametazonnal szemben, amely a CAR közvetlen aktiválására nem képes, csak a GR-on keresztül befolyásolja a

CAR expresszióját, a dehidroepiandroszteronról beigazolódott, hogy a CAR közvetlen aktiválásával hozzájárul számos CYP enzim, de különösen a CYP2B6 expresszió fokozódásához.

#### 4.2.3 KÖVETKEZTETÉSEK

A genotípus annak lehetőségét határozza meg, hogy normál vagy megváltozott működőképességű (csökkent vagy teljesen működésképtelen, esetleg fokozott aktivitású) enzim expresszálódjon, míg a nem-genetikai faktorok (pl. gyógyszeres kezelések, dohányzás, alkoholfogyasztás) módosíthatják a genotípus alapján becsülhető gyógyszer-metabolizáló képességet. A klinikai gyakorlatban viszonylag gyakori a multidrogtérápia, amely kombinált kezelések során, vagy egy adott kórkép különböző tüneteinek egyidejű kezelésekor, esetleg többszörös krónikus megbetegedések kezelésekor fordul elő. Az egyidejűleg alkalmazott gyógyszeres kezelések elkerülhetetlenül magukban hordozzák a gyógyszer-kölcsönhatások, így a farmakokinetikai gyógyszer-interakciók lehetőségét. A genetikai polimorfizmusok és a gyógyszer-interakciók miatt megváltozott gyógyszer-metabolizáló képesség egyben a nem-kívánt hatások megjelenésének kockázatát is növeli.

A CYP enzimek genetikai variabilitása, a *CYP* allélvariánsok előfordulási gyakorisága eltérő az egyes etnikai populációkban (Zanger 2013). A vizsgálatokban alkalmazott humán májszövet minták mindegyike a kaukázusi populációhoz tartozó donoroktól származott; az azonosított *CYP* allélok hasonló gyakorisággal fordultak elő, mint más kaukázusi populációkban egyetlen, a *CYP1A2* gén kivételével. A *CYP1A2\*1F* allél messze ritkábban fordult elő a humán mintáinkban ( $\leq 0,4\%$ ), mint ahogy az irodalmi adatok alapján várható lenne (32-57%), ami a korábbi publikációk feltételezhetően hibás haplotípus azonosításával magyarázható (**D11**). A *CYP1A2\*1M* volt viszont a leggyakoribb (~60%) allélvariáns a humán májszövet mintáinkban.

A májszövet minták *CYP* genotípus-fenotípus értékelése megmutatta, hogy a genetikai polimorfizmusok alapján meghatározott genotípusokból az egyes *CYP* izoenzimeknél eltérő mértékben következtethetünk a *CYP* fenotípusra (enzimaktivásra). A *CYP2D6* genotípusból viszonylag jól becsülhető a *CYP2D6* aktivitás; a májszövet minták több mint 2/3-ánál megegyezett a *CYP2D6* genotípus alapján becsült fenotípus a dextrometorfan *O*-demetiláz aktivitásból meghatározható *CYP2D6* metabolizáló fenotípussal (**D16**). Meg kell jegyezni, hogy a *CYP2D6* szabályzó régiójában lévő -1584C>G (rs1080985) mutáció *CYP2D6* expressziót és aktivitást fokozó hatása szerepet játszhatott egyes májszövet minták bizonytalan *CYP2D6* fenotípus becslésében, azonban a mintaszám növelésére lenne szükség ahhoz, hogy a -1584G hatását az egyes *CYP2D6* allélvariánsokhoz köthető megváltozott fenotípusra kimutathassuk. A *CYP2C9* genotípus alapú fenotípus predikció a májszövet minták több mint felénél szintúgy megfelelt a tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitás alapján értékelt fenotípusnak. Megállapítottuk továbbá, hogy a

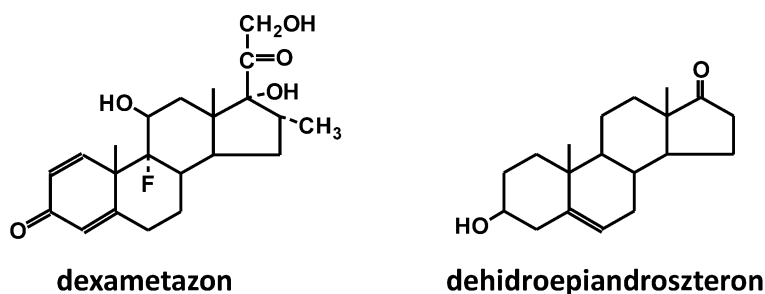
*CYP2C8*\*3 allélvariáns, amely kapcsolatosan fordult elő a *CYP2C9*\*2-vel, nem befolyásolta a tolbutamid 4-hidroxiázását (**D13**). A *CYP2C19* és *CYP2B6* genotípusokból levezethető fenotípus azonban csak részben (a májszövet minták 40%, illetve 28%-ában) egyezett meg a *S*-mefenitoin 4'-hidroxiláz, illetve a *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitások alapján meghatározott fenotípussal (**D14, D12**). Végül a *CYP1A2* polimorfizmusokból meghatározott genotípust kevésbé tartottuk alkalmasnak a *CYP1A2* aktivitás becslésére (**D11**). A *CYP* genotípus vizsgálatok során azon polimorf *CYP* allélok azonosítására törekedtünk, amelyek érdemi aktivitás-változást okoznak és a kaukázusi fehér populációra jellemzőek, azonban nem zárható ki, hogy egyes ritka variánsok nem kerültek meghatározásra.

A *CYP* genotípus azonban nem az egyedüli meghatározó tényező a végső fenotípus kialakulásában. A *CYP*-specifikus faktorok, a *CYP* enzim gátló és indukáló hatású gyógyszeres kezelések *CYP* aktivitást és/vagy expressziót módosító hatására számítottunk, azonban úgy tűnik, hogy nem *CYP*-szelektív hatások (krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin+klavulánsav terápia) is képesek voltak szignifikánsan befolyásolni a *CYP* fenotípust. A májszövet minták 15-34%-ánál volt tetten érhető a nem-genetikai tényezők *CYP* fenotípust módosító hatása. Ezért lényeges a *CYP* fenotípus becslésekor a genetikai tényezőkön kívül a nem-genetikai faktorokra is figyelemmel lenni, amint Waring (2020) és Stanke-Labesque és munkatársai (2020) is leszögezték az eredményeinkre hivatkozva. Azt is megállapíthattuk, 1) hogy a genetikai és nem-genetikai tényezők nem azonos arányban érvényesültek az egyes *CYP* enzimeknél, 2) valamint hogy a májszövet minták egy részénél, 15-39%-ánál továbbra sem magyarázható a *CYP* genotípus és fenotípus közti eltérés (genotípus-fenotípus „mismatch”).

A nem-genetikai faktorok közül a szteroidok okozta *CYP* indukcióról az irodalomban található ismereteket bővítettük a dexametazon (szintetikus glukokortikoid) és a dehidroepiandrosteron (hormon prekursor) humán *CYP* expressziót és aktivitást, illetve indukciót módosító hatásának kimutatásával, rávilágítva a két szteroid közti hasonlóságokra és eltérésekre (6. táblázat). Míg a dexametazon humán májsejtekben mérsékelte a *CYP1A1* indukcióját és nem befolyásolta a *CYP1A2* indukció következtében megemelkedő enzimaktivitást (**D17**), addig a dehidroepiandrosteron épp ellenkezőleg nem módosította a *CYP1A1* indukciót, viszont androgén receptor-függő módon fokozta a *CYP1A2* mRNS degradációját és ezzel hozzájárult a *CYP1A2* indukció csökkenéséhez (**D18**). A dehidroepiandrosteron *CYP1A2* mRNS stabilitást csökkentő hatása és a *CYP1A2* indukció mérséklése magyarázatul szolgálhat a dehidroepiandrosteron karcinogén folyamatokban megfigyelt kedvező sajátságára, a prekarcinogén anyagok metabolikus aktiválását és a karcinogén metabolitok képződését csökkentő hatására. A dexametazon *CYP1A1* indukciót módosító aktivitásával kapcsolatban fel kell hívni a figyelmet a patkány és az ember

közi különbségre. Míg patkány hepatocitákban a dexametazon a CYP1A1 induktor 3-metil-kolantrén hatását potenciózta, addig humán májsejtekben épp ellenkezőleg, enzimfehérje szinten redukálta a CYP1A1 expressziót (a *de novo* CYP1A1 fehérje szintézis gátlásával, vagy a CYP1A1 enzimfehérje degradációjának fokozásával) (D17). Glukokortikoid érzékeny szakaszok (GRE) megtalálhatók mind a patkány, mind az ember *CYP1A1* 1. intron régiójában, azonban ahogy több szerző is felhívta a figyelmet a dexametazon CYP1A1 indukciót módosító eltérő hatására patkánynál és embernél azt jelzi, hogy nem a GRE az egyetlen szabályzó mechanizmus a glukokortikoid hatás közvetítésében (Mullen Grey 2009; Wang 2009; Santes-Palacios 2016).

6. táblázat: A dexametazon és a dehidroepiandrosteron humán CYP expressziót és enzimaktivitást befolyásoló, valamint nukleáris receptort aktiváló hatása.



CYP1A1	CYP1A indukció során: mRNS expresszió nem változik ↓ enzimfehérje expresszió ↓ enzimaktivitás (7-etoxiresorufin <i>O</i> -dealkiláz)	CYP1A indukció során: mRNS expresszió nem változik
CYP1A2	CYP1A indukció során: enzimaktivitás (fenacetin <i>O</i> -dealkiláz) nem változik	CYP1A indukció során: ↓ mRNS expresszió (AR-függő degradáció fokozódás) ↓ enzimaktivitás (7-etoxiresorufin és fenacetin <i>O</i> -dealkiláz aktivitások)
CYP2B6	↑ mRNS expresszió ↑ enzimaktivitás ( <i>S</i> -mefenitoin <i>N</i> -demetiláz)	
CYP2C9	↑ mRNS expresszió ↑ enzimaktivitás (tolbutamid 4-hidroxiláz)	
CYP2C19	↑ mRNS expresszió ↑ enzimaktivitás ( <i>S</i> -mefenitoin 4'-hidroxiláz)	
CYP3A4	↑ mRNS expresszió ↑ enzimaktivitás (midazolam 1'- és 4-hidroxiláz, nifedipin oxidáz)	
GR <sup>a</sup>	aktiválja	nem aktiválja
PXR <sup>a</sup>	aktiválja	aktiválja
CAR <sup>a</sup>	GR szabályozza a CAR expresszióját	aktiválja
AR <sup>a</sup>		aktiválja

<sup>a</sup>GR glukokortikoid receptor; PXR pregnán X receptor; CAR konstitutív androsztán receptor; AR androgén receptor



Mindkét szteroid szignifikánsan megnövelte a gyógyszer-metabolizmus szempontjából lényeges CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek expresszióját és aktivitását humán májsejtekben (D19). Azonban a CYP expresszió szabályzásában részt vevő nukleáris receptorokra gyakorolt hatásuk mutatott eltéréseket (6. táblázat). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a dexametazon aktiválja a CYP enzimek szabályzásában szerepet játszó GR-t és PXR-t, míg a CAR-t közvetlenül nem képes aktiválni, azonban a CAR expresszióját a GR-on keresztül fokozza (Pascussi 2003a). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a dehidroepiandroszteron számos, a CYP2 családdhoz tartozó enzim és a CYP3A4 indukcióját a nukleáris receptor PXR aktiválásával éri el (Ripp 2002). Saját eredményeink alapján a paletta kiegészülhetett a CAR-al, amelynek aktiválása hozzájárul a CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és a CYP3A4 indukciójához (D19), illetve az androgén receptorral, amely a CYP1A2 indukció mérséklésében játszik szerepet (D18). Mivel a nukleáris receptorok aktiválása számos farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatás forrása lehet, a dehidroepiandroszteron „gyógyírként” való ellenőrizetlen alkalmazása különböző egészségügyi problémákra szigorúbb megfontolást kíván. Külön érdekesség, hogy Karamichos és munkatársai (2022) a keratoconus (a szem szaruhártyájának elvékonyodását eredményező megbetegedés) során megnövekedett dehidroepiandroszteron vérszint mellett bekövetkező ösztrom és ösztradiol szint csökkenést eredményeinkkel magyarázták. Ugyanis a CYP2B6 és CYP3A4 enzimek aktivitása meghatározó az ösztrogének hidroxilezésében és inaktiválásában, míg a CYP1A2 az ösztrom és ösztradiol szintézisében játszik szerepet, így a megemelkedett dehidroepiandroszteron vérszint CYP2B6 és CYP3A4 indukciót, valamint CYP1A2 szuppressziót kiváltó hatása szükségszerűen vezetett az ösztrogének koncentrációjának csökkenéséhez.

Könnyű belátni, hogy a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimek működését befolyásoló tényezők közül a genetikai faktoroknak köszönhetően egész életre szóló gyenge vagy fokozott enzimaktivitás becsülhető azoknál, akik polimorf allél(oka)t hordoznak. Míg a nem-genetikai faktoroknak köszönhető fenokonverzió átmeneti megváltozott gyógyszer-metabolizáló képességhez vezethet és addig juthat érvényre, amíg a kiváltó nem-genetikai tényező, mint a gyógyszeres kezelés, dohányzás, alkoholfogyasztás, megbetegedés stb. fennáll. A gyógyszer-metabolizáló képesség becslésére és klinikai alkalmazhatóságára vonatkozó vizsgálatainkat a következő fejezet foglalja össze.

#### 4.3 A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított terápia lehetőségei

A betegek gyógyszer-metabolizáló képességét befolyásoló genetikai polimorfizmusok azonosítása ma már viszonylag egyszerűen megoldható és a nem-genetikai tényezők miatt módosult gyógyszer-metabolizmus megállapítására is vannak törekvések. Például a CYP-szelektív

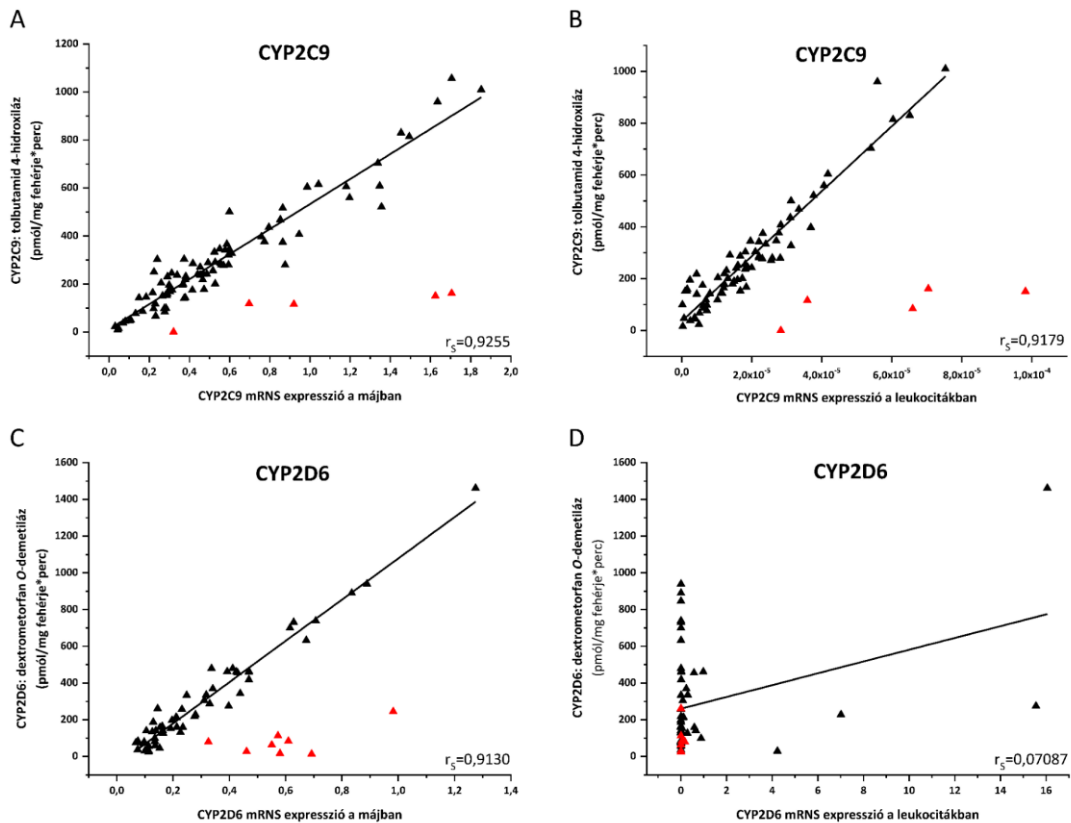
szubsztrátok farmakokinetikai vizsgálata (pl. a Genfi Egyetemen kifejlesztett 7-komponensű mikrokoktéllal) lehetőséget nyújthat a betegeknek a legfontosabb gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek aktivitásának becslésére (Ing Lorenzini 2021), bár a CYP-szubsztrát hatóanyagokkal való terhelés a vizsgálat során nem kikerülhető.

#### 4.3.1 A gyógyszer-metabolizáló képesség becslése (CYPtest<sup>TM</sup>) (D20, D21)

Átfogó, a teljes szervezetre kiterjedő gyógyszer-metabolizáló képesség megállapítása komoly kihívást jelent, azonban néhány egyszerűsítési lépést érdemes alkalmaznunk, így viszonylag használható információt lehet nyerni a betegeknek várható gyógyszer-metabolizmusról: 1) a gyógyszer-hatóanyagok biotranszformációja zömében a májban zajlik, ezért nem feltétlenül jelent többlet információt, ha minden egyes szerv metabolikus kapacitását meghatározzuk; 2) a metabolizálódó hatóanyagok java részét a CYP enzimek alakítják át; az egyéb enzimek aktivitásának becslése legfeljebb speciális esetekben, egyes hatóanyagoknál jelenthet hozzáadott értéket (ld. 4.3.5 fejezet, a klonazepam személyre szabott terápiája); 3) a forgalomban lévő hatóanyagok CYP metabolizmusát 90%-ban a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 és CYP3A5 enzimek katalizálják; más CYP enzimek vizsgálata olyan esetekben lehet indokolt, ha az enzim-térképezés alapján a felsoroltakon kívül egyéb CYP enzim domináns szerepe igazolódik (pl. CYP2C8, amely a paklitaxel metabolizmusát elsődlegesen katalizálja). Ezen CYP enzimek működőképességét és májban lévő aktivitását megbecsülni képes diagnosztikai módszer alkalmas lehet a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének jellemzésére és részét képezheti a személyre szabott gyógyszeres terápia megteremtésének. A megváltozott enzimaktivitást eredményező polimorf CYP allélok azonosítása mellett kísérletet tettünk az aktuális CYP fenotípus megállapítására, a csökkent vagy fokozott gyógyszer-metabolizmus becslésére is (D20).

A máj gyógyszer-metabolizáló képességének becslése májbiopszia mintákból rutinszerűen nem lehetséges a kockázatos és nehézkes mintavétel miatt, azonban a betegek vérmintájából izolált leukociták alkalmas biológiai mintát jelentettek. A teljes vérből történő meghatározás helyett a leukocitákból való mérést az indokolta, hogy a vér alakos elemeinek 99%-át kitevő vörös-vértestek sejtmagot nem tartalmaznak, így aktív RNS szintézis nem zajlik bennük. A vörös-vértestekben a gének mRNS expressziója a sejtmag elvesztése előtti állapotot tükrözi és a 120-napos perifériás vérben való élettartamuk alatt a transzkripciót érintő hatásokat már nem mutatják. A leukociták sejtmaggal és aktív transzkripcióval rendelkező sejtek, így a CYP expresszióban bekövetkező változások valós időben nyomon követhetők. A kérdés csak az volt, hogy a leukocita CYP mRNS expresszió tükrözi-e a májban mérhető CYP enzimaktivitásokat; azaz nyerhető-e a leukocitákból információ a máj gyógyszer-metabolizáló képességéről.

Humán májszövet mintákban mérhető CYP-szelektív enzimaktivitásokat (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A) összevetettük a májban és a leukocitákban lévő CYP mRNS expresszióval (D20). A májszövet donorok *CYP* genotípusát előzetesen meghatároztuk a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló, megváltozott CYP aktivitást eredményező allélvariánsok alapján (Függelék 12.1). A gyenge metabolizmushoz vezető *CYPnf/nf* genotípusú (*nf*: működésképtelen vagy csökkent működőképességű enzimet eredményező allél) májszövet mintákat kihagytuk a korreláció értékeléséből (23. ábra). Továbbá eltekintettünk a *CYP1A2* allélvariánsoktól, valamint az expressziót befolyásoló *CYP2C19\*17*, *CYP2D6\*5* (teljes gén hiány)



23. ábra: A humán májszövetben és a leukocitákban mérhető **CYP mRNS expresszió és CYP-szelektív enzimaktivitások közti korreláció**. A és B) Szignifikáns korrelációt mutattunk ki a máj CYP2C9 aktivitása (tolbutamid 4-hidroxiláz) és a máj, illetve a leukociták CYP2C9 mRNS expressziója között. C) Szignifikáns korrelációt találtunk a máj CYP2D6 aktivitása (dextrometorfan *O*-demetiláz) és a máj CYP2D6 mRNS expressziója között, D) azonban a máj CYP2D6 aktivitása és a leukociták CYP2D6 expressziója között nem volt kimutatható összefüggés. A pirossal jelzett májszövet mintákat a *CYP* genotípus alapján gyenge metabolizálónak minősítettük és a korrelációs analízisből kihagytuk.  
 $r_s$  Spearman korrelációs koefficiens

allélvariánsoktól és a *CYP2D6\*1* duplikációtól/multiplikációtól, hiszen a CYP2C19 és CYP2D6 mRNS szintek tükrözik ez utóbbi allélok hatását. A kaukázusi populációban vélhetően CYP3A aktivitás fokozódást jelentő *CYP3A5\*1* vad-típusú allélra pedig figyelemmel voltunk a CYP3A aktivitások és a CYP3A4 mRNS expresszió összevetése során. Szoros összefüggést találtunk a

májban lévő, a gyógyszer-metabolizmus szempontjából leglényegesebb CYP enzimek, a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és a CYP3A4 mRNA expressziója és enzimaktivitásai között. A leukocitákban lévő mRNA expresszió azonban csak a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 májban mérhető enzimaktivitásait tükrözte, a leukocita CYP2B6 és CYP2D6 expressziót nem találtuk alkalmasnak a máj CYP2B6 és CYP2D6 enzimaktivitásainak becslésére (a 23. ábra példaként a máj CYP2C9 és CYP2D6 aktivitásainak és a máj, illetve leukocita CYP2C9 és CYP2D6 mRNA expressziójának összefüggéseit mutatja; az egyéb CYP enzimekre vonatkozó összefüggések megjelenítése a **D20** publikációban található). A májszövet minták CYP aktivitásaiból kalkulált határértékek [1. kvartilis: gyenge és intermedier metabolizáló (PM-IM), 3. kvartilis: intermedier és normál (extenzív) metabolizáló (IM-EM) közti határérték] a leukocitákban tapasztalt CYP mRNA expresszió kategóriák határértékeit is kijelölték (7. táblázat), amelyeket a későbbi klinikai vizsgálatokban a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének meghatározásakor irányadónak tekintettünk.

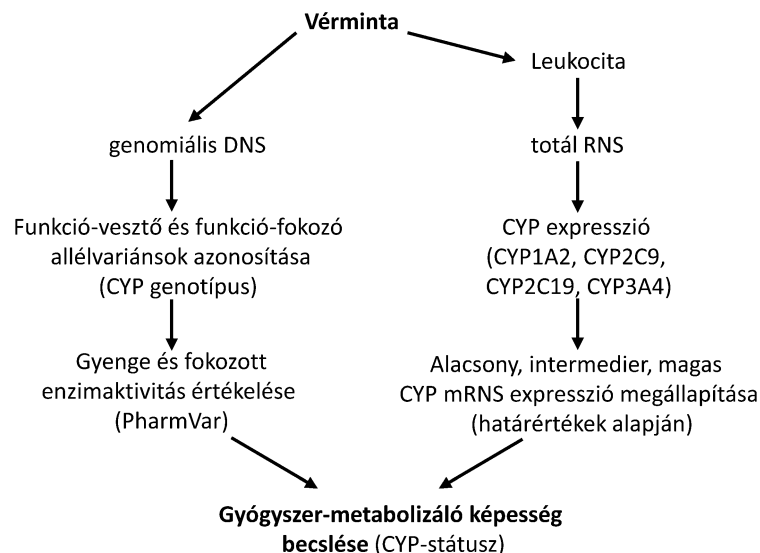
7. táblázat: A leukocitákban mérhető CYP mRNA expresszió alapján meghatározott gyógyszer-metabolizáló fenotípus kategóriák közti határértékek.

	Határértékek	
	PM - IM <sup>a</sup>	IM - EM <sup>a</sup>
CYP1A2	10 <sup>-4</sup>	2*10 <sup>-3</sup>
CYP2C9	5*10 <sup>-6</sup>	2,5*10 <sup>-5</sup>
CYP2C19	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
CYP3A4	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>PM gyenge, IM intermedier, EM normál (extenzív) metabolizáló fenotípus

A betegek CYP-státuszának megállapítása tehát általában két lépcsőben történik (24. ábra): 1) a klinikai következményekkel járó polimorf CYP allélok azonosításával határozzuk meg a CYP genotípust, 2) majd a leukocita CYP mRNA expresszióval együtt értékeljük a máj gyógyszer-metabolizáló képességét. A máj CYP2D6 enzimaktivitása viszonylag jó egyezéssel becsülhető a CYP2D6 genotípus alapján (**D16**), a CYP1A2 aktivitást a leukociták mRNA expressziójából állapítjuk meg, míg CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4/5 enzimaktivitásokra a CYP genotípus és a leukocita CYP mRNA expresszió együttes értékelésével következtethetünk. A CYP-státusz - a CYP genotípus és CYP expresszió - meghatározás metodikai részletei a **D20** és **D21**, továbbá a **D12**, **D14-16** publikációkban található. A **D20** publikációban bemutatott becslési eljárás CYP expressziós pillére finomításra szorult, az egyes lépések (RNS izolálás, reverz transzkripció, kvantitatív PCR) optimalizálására volt szükség, ugyanis a CYP expressziót csökkentő állapotok, mint a megbetegedések miatt az alacsony leukocita CYP mRNA szintek érzékenyebb meghatározására volt szükség (**D21**). Így végül egy olyan diagnosztikai eljáráshoz jutottunk,

amellyel a betegek gyógyszer-metabolizáló képessége becsülhető és az egyes hatóanyagok metabolikus átalakítása szempontjából érzékeny, kockázatot hordozó (gyenge vagy fokozott metabolizáló képességű) betegek azonosíthatók. Az eljárás **CYPtest™** néven bejegyzésre került (magyar lajstromszám: 204 638; nemzetközi lajstromszám: 1 087 670).



24. ábra: **CYPtest™**: a gyógyszer-metabolizáló képesség becslése vérmintából

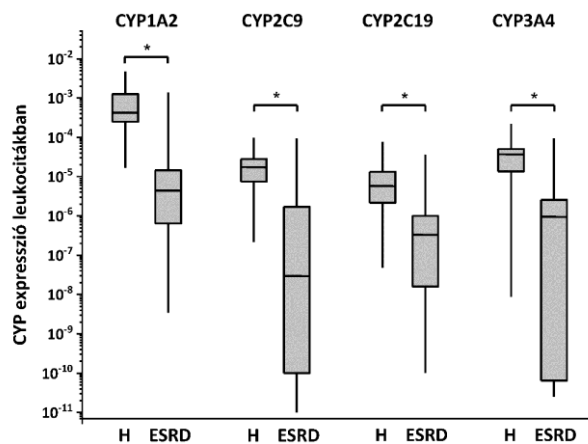
A CYP-státusz, azaz a genetikai és nem-genetikai hatások eredőjeként kialakuló CYP fenotípus becslése elősegítheti az ésszerű, személyre szabott hatóanyag dozírozás kialakítását a betegeknél. A CYPtest™ alapján történő gyógyszer-metabolizáló képesség becslést olyan krónikus betegeknél szándékoztuk alkalmazni, akiket szűk terápiás indexű hatóanyagokkal kezelnek (olyan hatóanyagok, amelyeknek a terápiás hatáshoz szükséges, de toxikus mellékhatást még nem előidéző koncentráció tartománya a vérben keskeny), vagy ahol a személyre szabott gyógyszeres kezelés jelentősen javíthatja a gyógyszerek hatékonyságát és nagyban csökkentheti a toxicitás kockázatát.

#### 4.3.2 Végstádiumú vesebetegek gyógyszer-lebontó képessége (D21)

A krónikus vese-megbetegedések magas aránya (Európa felnőtt lakosságának 10-15%-a), valamint a csökkent veseműködés szövődményes betegségeinek (pl. kardiovaszkuláris betegségek) kialakulása komoly egészségügyi terhet jelent hazánkban és a fejlett országokban is (Hill 2016; Go 2016). A veseelégtelenség a vesebetegségek legsúlyosabb, irreverzibilis állapota, amely vesepótló dialízissel ugyan orvosolható, az optimális megoldást azonban a veseátültetés jelenti. Az a tény, hogy a krónikus betegségekkel küzdők közül a vesebetegek terápiájában alkalmazzák talán a legtöbb gyógyszer-hatóanyagot, valamint, hogy a vesén keresztül történő gyógyszer/metabolit kiürítés is károsodik a vese elégtelen működése miatt, különösen indokoltá teszi a vesebetegek körültekintő gyógyszeres kezelését. Ráadásul az egyéb szervekben, főként a

májban zajló gyógyszer-metabolizmus csökkenését is megfigyelték beszűkült vesefunkciójú betegeknel (Yeung 2014). A májban lévő CYP aktivitás csökkenés a vesekárosodás következtében a vérben felhalmozódó urémiás toxinok (pl. indoxil-szulfát, hippursav, *p*-krezol) és egyéb felszabaduló mediátorok (citokinek, mellékpajzsmirigy hormon) számlájára írható, amelyek közvetlenül gátolhatják a CYP enzimek működését, vagy befolyásolhatják a CYP expressziót (Michaud 2006; Barnes 2014). A CYP expresszió változás igazolására összehasonlítottuk végstádiumú vesebetegek (N=105) és normál vesefunkciójú szervdonorok (N=110) leukocita CYP expressziójából becsülhető gyógyszer-metabolizáló képességet (D21).

Egészséges vesefunkciójú szervdonorok legalacsonyabb és legmagasabb CYP expressziója között két nagyságrendnyi különbséget mértünk, kivéve a CYP3A4-et, ahol 5-nagyságrendnyi eltérést találtunk, míg a vesebetegeknel nagyobb, 5-7-nagyságrendnyi különbség volt megfigyelhető a legalacsonyabb és a legmagasabb CYP expresszió között (25. ábra). Másrészt az egészséges vesefunkciójú szervdonorokhoz képest a vesebetegek CYP mRNS expressziója szignifikánsan



25. ábra: Végstádiumú vesebetegek (ESRD) és egészséges vesefunkciójú szervdonorok (H) leukocita CYP expressziója. A vízszintes vonalak a mediánt jelzik. \* $P < 0,0001$

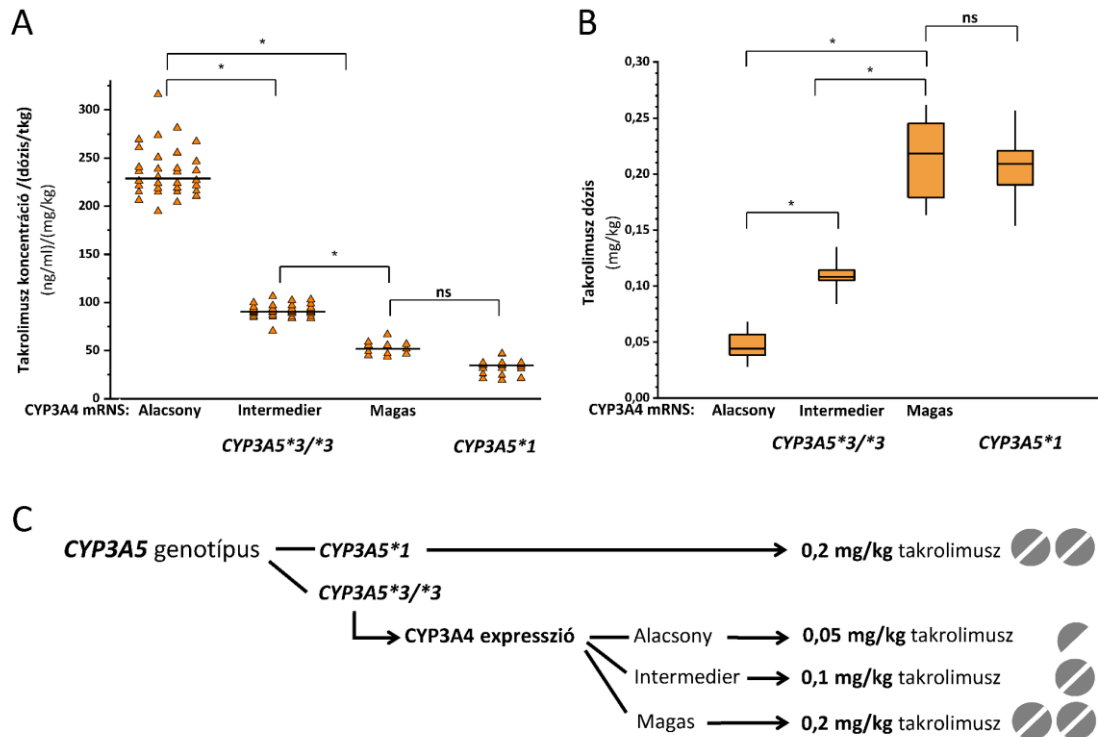
alacsonyabb volt, ami jelentősen redukált CYP enzimaktivitásokra engedett következtetni. A vesebetegek között számottevően magasabb arányban fordultak elő alacsony CYP expressziójú, gyenge metabolizáló képességűek, mint a szervdonorok között (vesebetegek: CYP1A2 70%, CYP2C9 77%, CYP2C19 73%, CYP3A4 51%; szervdonorok: CYP1A2 30%, CYP2C9 14%, CYP2C19 30%, CYP3A4 23%,  $P < 0,0001$ ). Az alacsony CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 expresszió gyakoribb előfordulása alátámasztotta a vesebetegeknel megfigyelt, CYP enzim működéshez köthető csökkent gyógyszer-metabolizmust (Yeung 2014; Lea-Henry 2018).

#### 4.3.3 Szervátültetésen átesett betegek CYP3A-státuszhoz igazított kalcineurin inhibitor terápiaja (D22-24)

Magyarországon több ezer beteg szenved irreverzibilis szervkárosodásban (máj, vese, szív, tüdő); a károsodott szerv funkcióit pótló kezelések hiánya, korlátozott elérhetősége, vagy az életkörülményeket erősen meghatározó volta miatt számukra gyakran az egyetlen radikális és hosszú távú túlélést biztosító megoldás a transzplantáció (Nemes 2019). Évente több száz szervátültetés történik hazánkban (2019-ben 271 vese, 79 máj, 72 szív, 18 tüdőátültetés volt; <https://www.ovsz.hu>), igen jó eredménnyel (80% feletti egy éves túlélés). A túlélési prognózist az alapbetegség és a beteg általános állapota mellett az operáció és az azt követő néhány hónap történései (műtéti stressz, immunológiai reakciók, fertőzések, gyógyszer-interakciók) nagyban meghatározzák (S9). A beültetett szerv (graft), valamint a betegek túlélését javíthatja a gyógyszer-metabolizáló képesség csökkent vagy fokozott működésének időben való felismerése. Májtranszplantáció esetén a donor máj, míg vese-, szív- és tüdőtranszplantációt követően a recipiens gyógyszer-metabolizáló kapacitása fogja meghatározni a műtétet követő korai időszakban a gyógyszeres terápia kimenetelét. A transzplantált betegek gyógyszeres kezelésének középpontjában a szervkilökődés megelőzése áll, amelynek sarokkövét a kalcineurin inhibitor terápia jelenti. A szűk terápiás indexű kalcineurin inhibitoroknál (ciklosporin, takrolimusz) a terápiás hatást (kilökődés kivédése) és a mellékhatásokat (fertőzések, vesekárosodás) kiváltó vérkoncentrációk közti tartomány keskeny, ezért a vérszintek folyamatos ellenőrzése szükséges, amely a korai posztoperatív időszakban, az immunszuppresszív hatóanyagok adagolásának beállítása során különösen fontos. A CYP3A4 és CYP3A5 enzimek jelentősége a ciklosporin és a takrolimusz metabolizmusában jól ismert, a kalcineurin inhibitor vérszintek és a *CYP3A* genetikai polimorfizmusok, különösen a *CYP3A5* genetikai variabilitása közti összefüggések irodalma tekintélyes (Kurzawski 2013; S5). Annak ellenére, hogy a *CYP3A5* enzim expressziója a májban messze elmarad a *CYP3A4* expressziótól (Daly 2006), a takrolimusz metabolizmusában domináns szerepet tölt be, így a *CYP3A5\*1* vad-típusú allélt hordozóknál fokozott takrolimusz lebontásra kell számítani. A teljes funkció-kieséssel társuló *CYP3A5\*3* allél előfordulása a kaukázusi populációban azonban igen magas (88-97%), így a betegek nagy részénél a kalcineurin inhibitorok farmakokinetikai viselkedését a *CYP3A4* aktivitása határozza meg, amely a *CYP3A4* genotípus alapján kevéssé becsülhető. Ezért kísérletet tettünk arra, hogy **májtranszplantált betegeknél** (N=131) a donor máj CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és *CYP3A4* mRNS expresszió) és a recipiensek stabil ciklosporin, illetve takrolimusz vérszintje között összefüggést találjunk, amely kiinduló pontja volt a terápiás hatáshoz szükséges dózisirány meghatározásának (D22).

A beültetésre került májgraftokat két csoportba soroltuk: *CYP3A5* vad-típusú allélt hordozók (*CYP3A5\*1/\*3* vagy *CYP3A5\*1/\*1* genotípusúak) és *CYP3A5*-t nem-expresszálók

(*CYP3A5*\*3/\*3 genotípusúak). Ez utóbbiakat további 3 alcsoportra osztottuk a donor leukocita CYP3A4 expresszió alapján, alacsony, intermedier és magas CYP3A4 mRNA expresszálókra (26. ábra). A CYP3A5-t expresszáló (*CYP3A5*\*1 allélt hordozó), vagy a CYP3A4 magas expressziójú (*CYP3A5*\*3/\*3 genotípusú) májgrafttal transzplantált betegeknél szignifikánsan alacsonyabb dózis/testtömeggel normalizált kalcineurin inhibitor vérszintek alakultak ki, mint az intermedier és alacsony CYP3A4 expressziójú (*CYP3A5*\*3/\*3) májgraftok esetén (a 26.A ábra a takrolimuszra



26. ábra: A donor máj CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 mRNA expresszió) befolyásolta a **májtranszplantált betegekben kialakuló takrolimusz** vérszintet (A) és a terápiás hatáshoz szükséges dózisingényt (B) a transzplantációt követő korai időszakban. C) Az átültetésre kerülő májgraft CYP3A-státusza alapján előre meghatározható a takrolimusz dózisingény. A vízszintes vonal a mediánt jelöli. Alacsony, intermedier, magas: a CYP3A4 mRNA expresszió mértéke (ld. 7. táblázat); ns nem szignifikáns; tkg testtömeg kg; \* $P < 0,0001$

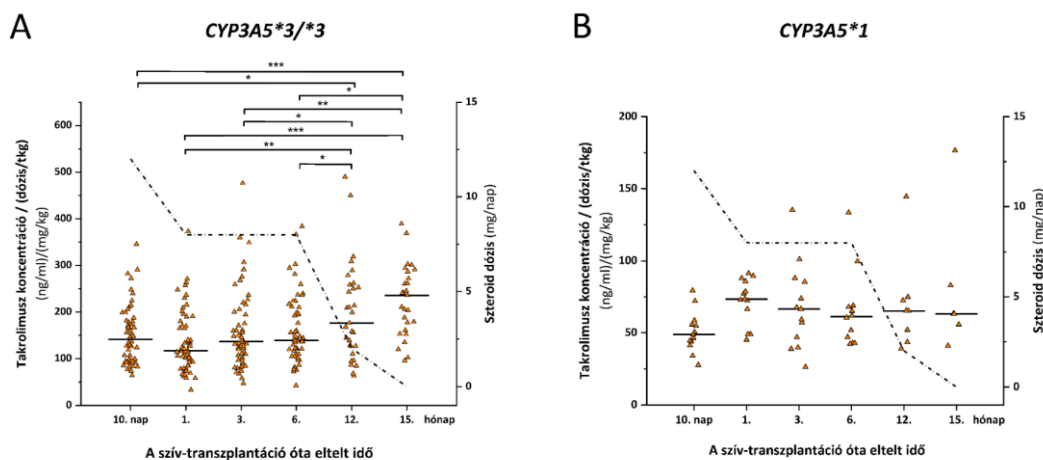
vonatkozó adatokat jeleníti meg; a ciklosporinnal kapcsolatos eredmények a **D22** publikációban található(k). Logikus következmény, hogy a terápiás takrolimusz (11 ng/ml), illetve ciklosporin (250 ng/ml) vérkoncentráció eléréséhez szükséges dózisingény is eltérő volt a különböző CYP3A-státuszú májgrafttal transzplantált betegeknél (takrolimusz: 26.B ábra; ciklosporin: **D22** publikáció). Intermedier CYP3A4 mRNA expressziójú (*CYP3A5*\*3/\*3 genotípusú) szerv átültetését követően a kalcineurin inhibitor dózisingény többé-kevésbé megegyezett a klasszikus klinikai protokoll által javasolt kezdő dózissal (takrolimusz: 0,1 mg/kg; ciklosporin: 10 mg/kg), míg az alacsony és magas CYP3A4 expressziót mutató, illetve a *CYP3A5*\*1 vad-típusú allélt hordozó májgraftok a kezdő dózis jelentős módosítását igényelték a recipienseknél (26.C ábra).



**Szívátültetésen átesett betegek**nél (N=232) a májtranszplantáltakhoz hasonlóan a CYP3A-státusz alapján értékeltük a takrolimusz vérszinteket (dózis/testtömeggel normalizált) és dózisigényt (**D23**). Talán felesleges hangsúlyozni, hogy szívtranszplantáltaknál a gyógyszerhatóanyagok metabolizmusáért a recipiens máj a felelős, így a recipiens leukocitáinak CYP3A-státuszából következtethetünk a máj takrolimusz-lebontó képességére. A betegeknek magas CYP3A4 mRNA expressziót csak elvétve mértünk a szívtranszplantáció időpontjában (0,86%, szemben a magas CYP3A4 expressziót mutató májdonorok 12,5%-val; **D24**), míg alacsony CYP3A4 expressziót detektáltunk a betegek több mint felénél (szívtranszplantáltak: 56%; májdonorok: 40,2%). Ezért csak 3 csoportnál, *CYP3A5\*1* allélt hordozóknál, valamint alacsony és intermedier CYP3A4 mRNA expressziójú (*CYP3A5\*3/\*3* genotípusú) betegeknek értékeltük a takrolimusz vérszinteket és a dózisigényt. Szignifikáns takrolimusz vérszint (dózis/testtömeggel normalizált) és dózisigény különbségeket állapítottunk meg a szívátültetésen átesett betegeknek is, hasonlóan a májtranszplantáltakhoz. A klasszikus kezelési protokoll által ajánlott kezdő takrolimusz dózis (0,1 mg/kg) azonban mindhárom csoportnál módosításra szorult a terápiás vérkoncentráció fenntartása érdekében. A *CYP3A5\*1* allélt hordozóknál 2,4-szeres (0,240±0,081 mg/kg), az intermedier CYP3A4 expressziót mutató csoportban 1,4-szeres (0,138±0,0283 mg/kg) dózis emelésre, míg az alacsony CYP3A4 expressziójú betegeknek 20%-os dózis csökkentésre (0,080±0,0266 mg/kg) volt szükség.

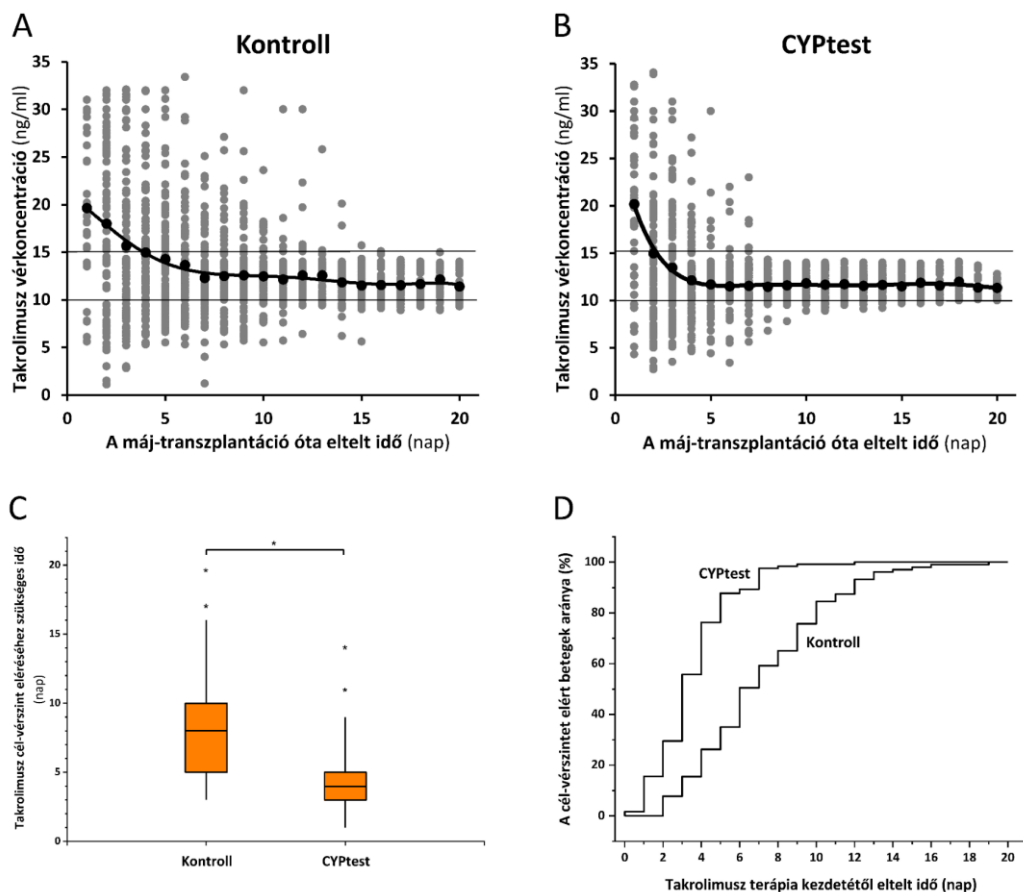
A transzplantált betegek immunszuppresszív fenntartó terápiájának része a kalcineurin inhibitor mellett a szteroid metilprednizolon vagy prednizolon kezelés is. Az operációt követően a szteroid terápia magas (250-500 mg) dózissal indul, majd az első néhány napban jelentősen csökken, szívtranszplantált betegeknek a 3. hét végére 8 mg napi dózissá, és általában az első évet követően kerül visszavonásra (27. ábra). Számos szteroidról, köztük a metilprednizolonról és a prednizolonról is ismert, hogy indukálják a CYP3A4 transzkripcióját, amely fokozott CYP3A4 expresszióhoz vezet (Matsunaga 2012; **S5, S10**); a szteroid dózis csökkentése és visszavonása pedig a CYP3A4 kifejeződés és aktivitás csökkenését eredményezi. A takrolimusz-metabolizáló képesség időbeli alakulását követtük szívátültetésen átesett betegeknek a transzplantációt követő első 15 hónapban és megállapítottuk, hogy 1) a műtétet követően alkalmazott magas metilprednizolon dózis jelentősen javította az alacsony posztoperatív CYP3A4 expressziót már az első hónap végére (**D23**); 2) a metilprednizolon dózis redukciójával párhuzamosan fokozatosan nőtt a dózis/testtömeggel normalizált takrolimusz vérszint a *CYP3A5\*3/\*3* genotípusú betegeknek (27.A ábra), ami azt is jelenti, hogy a takrolimusz napi dózisának fokozatos csökkentésére volt szükség a terápiás vérszint fenntartásához; 3) a metilprednizolon dózis változtatások nem okoztak szignifikáns takrolimusz vérszint változást a *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknek (27.B ábra).

Mindez megerősíti azt a humán hepatocitákon kapott eredményt is, miszerint a metilprednizolon és prednizolon képes a CYP3A4 expressziót indukálni, de a CYP3A5 gén transzkripcióját nem (Matsunaga 2012).



27. ábra: A normalizált **takrolimusz** vérszint alakulása *CYP3A5\*3/\*3* genotípusú (A) és *CYP3A5\*1* allélt hordozó (B) **szívtranszplantált betegek**nél. A szaggatott vonal a metilprednizolon napi dózisának változását jelzi a transzplantációt követő 15 hónap során. A vízszintes vonalak a mediánt jelölik. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ , \*\*\* $P < 0,0001$

A kezdő takrolimusz dózis módosítására tettünk javaslatot máj- és szívtranszplantált betegeknek a CYP3A-státusz alapján (D22, D23). A dózis-módosítás klinikai jelentőségét, a recipiensek számára jelentett előnyöket is elemeztük májtranszplantált betegeknek a donor máj CYP3A-státusza alapján (26.C ábra, N=112) és a klasszikus klinikai gyakorlat szerint (0,1 mg/kg kezdő dózis, majd a napi takrolimusz vérszint alapján igazított dózissal, N=101) végzett takrolimusz kezelések összehasonlításával. A kétféle dozírozási stratégia dózis optimalizálására, a kezelés hatékonyságára (akut kilökődési epizódok) és a mellékhatások (vesetoxicitás, fertőzések) megjelenésére gyakorolt hatását vetettük össze (D24). A donor CYP3A-státusza alapján kezelt CYPtest csoportban a betegek több mint a felénél a kezdeti takrolimusz dózis módosítására volt szükség, és ezzel a stabil terápiás vérkoncentrációt rövidebb idő alatt sikerült elérni, mint a vérszinthez igazított takrolimusz kezeléssel (kontroll csoport:  $8,33 \pm 3,55$  nap, CYPtest csoport:  $4,56 \pm 2,07$  nap,  $P < 0,0001$ ) (28. ábra). A műtét utáni 8. napra a CYP3A-státusz alapján kezelt betegek zöménél (97,5%) stabil terápiás vérszint alakult ki, míg a hagyományos klinikai protokoll szerint kezelt kontroll betegek mindössze 59%-ánál sikerült a terápiás takrolimusz vérszintet beállítani (28.D ábra). A stabil terápiás vérszint gyors elérése maga után vonta az akut szervkilökődési epizódok számának (kontroll: 23,8%, CYPtest: 3,6%,  $P < 0,0001$ ) és a takrolimusz kezeléshez köthető vesekárosodás kialakulásának szignifikáns csökkenését (kontroll: 27%, CYPtest: 8%,  $P = 0,0004$ ), ugyanakkor a fertőzések előfordulási gyakoriságát nem befolyásolta (kontroll: 5,9%, CYPtest: 3,6%,  $P > 0,05$ ).



28. ábra: Májtranszplantált betegek **takrolimusz vérszintjének** alakulása a vérszinthez (kontroll) és a májgraft CYP3A-státuszához (CYPtest) igazított kezelést követően. A és B) A napi takrolimusz vérszintek alakulása a kontroll és CYPtest betegcsoportokban (szürke: egyedi vérszint értékek, fekete: medián értékek; a két vízszintes vonal a terápiás koncentráció tartományt jelöli). C) A terápiás vérszint eléréséhez szükséges idő (\*P<0,0001). D) A takrolimusz cél-vérszintet elért betegek aránya a transzplantációt követő 20 napban.

A terápiás vérszintnél alacsonyabb takrolimusz koncentrációk (<10 ng/ml) a beültetett szerv akut kilökődését eredményezhetik (Venkataraman 2001; Staatz 2001; Masuda 2006), amely a takrolimusz dózis emelésével vagy nagy-dózisú szteroid terápiával („steroid-shot”) szerencsésen kezelhető. Ugyan az akut kilökődés a hosszú távú túlélést úgy tűnik, nem befolyásolja (Choudhary 2017; Dogan 2018), a transzplantált máj átmeneti funkció-kiesése a kilökődési epizód alatt jó eséllyel elkerülhető a CYP3A-státuszhoz igazított takrolimusz terápia alkalmazásával. A magas takrolimusz vérkoncentráció (>20 ng/ml) által kiváltott vesekárosodás az immunszuppresszió egyik gyenge pontja. Bár a takrolimusz vesekárosító hatása kisebb, mint a ciklosporin kezelés okozta toxicitás, a korai poszt-transzplantációs periódusban bekövetkező vesekárosodás jelentősen rontja a hosszú távú túlélést (Ojo 2007), ezért elengedhetetlen a vesetoxicitás kockázatának visszaszorítása. Volt néhány nem túl sikeres próbálkozás kalcineurin inhibitor-mentes immunszuppresszív terápia kialakítására, azonban a szakmai ajánlások és a transzplantációs

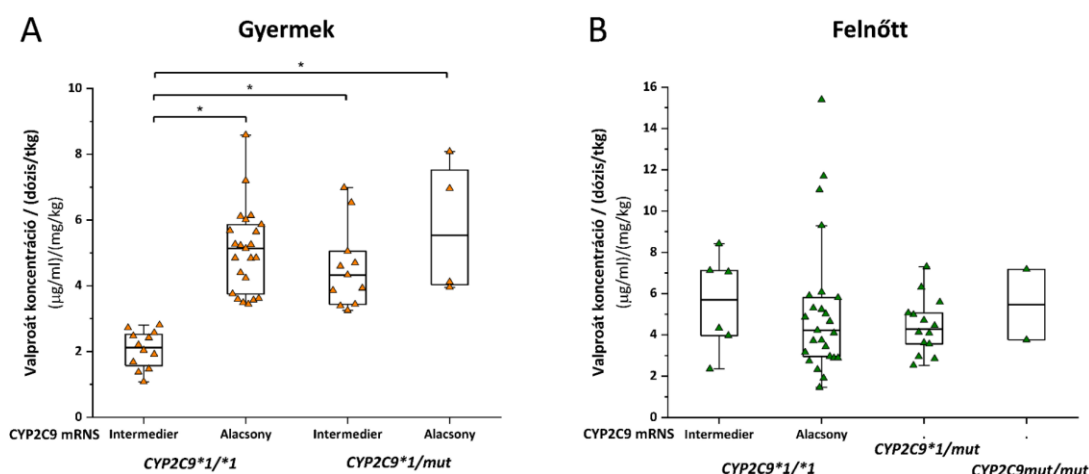
centrumok jelenlegi gyakorlata azt mutatja, hogy a kalcineurin inhibitor terápia kevésbé megkerülhető. Ezért lehet hasznos a CYP3A-státuszhoz igazított dozírozás kialakítása, amely igazoltan csökkentette a vesetoxicitás és az akut kilökődés kockázatát.

#### 4.3.4 A CYP2C9 jelentősége epilepsziás gyermekek valproát terápiájában (D25, D26)

Az epilepszia (népies nevén frász) az agy fokozott ingerlékenysége következtében kialakuló, hirtelen és spontán visszatérő tünetegyüttes; az agyi izgalmi és gátló folyamatok egyensúly-megbomlása miatt létrejövő működési zavar, amely a néhány másodperces „elbambulástól” a percekre át tartó epilepsziás görcsrohamig terjedő tünetekhez vezethet (Fisher 2014). Előfordulási gyakorisága Európában 0,5-0,7%, Magyarországon 0,3-0,6% a teljes népességben, csecsemő és gyermekkorban valamivel gyakoribb, 1% körüli (Fogarasi A 2003; Mikudina B 2011; Fiest 2017). A betegek nagy része gyógyszeres kezeléssel roham-mentesíthető; az antiepileptikumok a kóros izgalmi állapotot csökkentik és a roham kifejlődését visszaszorítják. Az epilepszia kezelésében az elsőként választható gyógyszerek egyike a valproát, amelyet a betegek többsége alapvetően jól tolerál, ritkán fordulnak elő komolyabb mellékhatások (csontvelő-szuppresszió, véralvadási zavar, májkárosodás, magas ammónia szint okozta idegrendszeri károsodás, csont-anyagcsere zavar) a krónikus terápia során (Peterson 2005; Chateauvieux 2010; Nanau 2013). A mellékhatások szempontjából különösen érzékeny betegcsoportot jelentenek a gyermekek, főként a 2 év alattiak (Guerrini 2006; Nanau 2013). A mellékhatások kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, de a citotoxicitásért és a mitochondriumok működési zavaráért úgy tűnik, maga az anyavegyület és a telítetlen, kettőskötést tartalmazó metabolitok lehetnek felelősek (Silva 2008). A valproát egy elágazó szénláncú karbonsav, amely a májban intenzív átalakuláson megy keresztül, a bejuttatott dózis mindössze 3%-a ürül változatlan formában. Felnőttekben a metabolizmus fő útvonala a glukuronid konjugáció (50%) és a mitochondriális  $\beta$ -oxidáció (40%), ez utóbbi a farmakológiailag aktív 2-én-valproát és az inaktív 3-oxo-valproát képződéséhez vezet, míg a CYP enzimekhez köthető hidroxivalproát metabolitok (3-, 4- és 5-hidroxivalproát) és a 4-én-valproát képződés csak a metabolikus útvonalak 10%-át jelentik (Függelék 12.7) (Ghodke-Puranik 2013). A 4-én metabolit a mitochondriumban 2,4-dién-valproáttá alakul tovább, amely glutationnal konjugálódva ürül a szervezetből. Amennyiben a glukuronid-konjugáció vagy a  $\beta$ -oxidáció nem, vagy csak alacsony szinten működik, a metabolizmus a CYP enzimek felé terelődik. Csecsemőkben és kisgyermekekben az UDP-glukuronil transzferázok igen alacsony szinten expresszálódnak, későbbi életkorban fokozatosan emelkedik a glukuronidáció mértéke, azonban előfordulhat, hogy még 10-15 éves korra sem éri el a felnőtt szintet (Ginsberg 2002). Másrészt a valproát és néhány metabolitja gátolja a mitochondriális  $\beta$ -oxidációt (Silva 2008). Mindebből

könnyen következtethetünk arra, hogy gyermekekben a valproát átalakításában sokkal nagyobb szerep jut a CYP enzimeknek, mint felnőttekben.

A valproát CYP metabolizmusát elsődlegesen a CYP2C9 enzim katalizálja, a CYP2A6 csak minimális mértékben járul hozzá a valproát átalakításához (Kiang 2006). A polimorf *CYP2C9* allélok (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*) CYP2C9 enzimaktivitást csökkentő hatását a 4.2.1 fejezetben részleteztem. Mivel a nem-genetikai tényezők okozta fenokonverzió szintén kihatással van a CYP2C9 fenotípusos megjelenésére, a CYP2C9 enzim szerepét a valproát eliminációjában mind a polimorf allélok mind a CYP2C9 expresszió együttes figyelembevételével értékeltük valproáttal kezelt gyermekeknél (<15 év) és felnőtteknél (29. ábra) (D25, S4). Epilepsziával kezelt gyermekek CYP2C9-státusza összefüggést mutatott a normalizált valproát vérszintekkel (dózis/testtömeggel normalizált valproát koncentráció), 18 éves vagy annál idősebb felnőtteknél azonban a CYP2C9-



29. ábra: A CYP2C9-státusz és a **valproát vérszint** összefüggései gyermekeknél és felnőtteknél. A) Gyermekekben (<15 év) a *CYP2C9* genotípus és CYP2C9 expresszió alapján megállapítható CYP2C9-státusz szignifikánsan befolyásolta a normalizált valproát vérszintet, B) míg felnőttekben (≥18 év) nem mutattunk ki összefüggést a valproát vérszintek és a CYP2C9-státusz között. \*P<0,01

státusz semmilyen hatással nem volt a valproát koncentrációra. Ez egyben a fenti megállapításunk megerősítését is jelenti; azaz, hogy a valproát metabolizmusát gyermekekben elsősorban a CYP2C9 enzim katalizálja, míg felnőttekben a CYP2C9 jelentősége elhalványul. Gyermekeknél a *CYP2C9* funkció-vesztő mutációinak hatását csak heterozigóta, *CYP2C9\*1/\*2* és *CYP2C9\*1/\*3* genotípusú betegeknél értékeltük. Ugyanis a gyermekek bevonásával végzett vizsgálataink során az egyik kisbetegnél röviddel a terápia megkezdése után a valproát kezelés rendkívül súlyos tüneteket (csontvelő-szuppresszió, ammónia és alkalikus foszfatáz szérum szintek drasztikus emelkedése) váltott ki, amelyet a betegnél azonosított *CYP2C9\*3/\*3* genotípussal hoztunk összefüggésbe (S7). A valproát visszavonását követően a beteg állapota normalizálódott. Az esetet követően, a neurológus kezelőorvosok döntése értelmében a drasztikusan csökkent valproát-

metabolizmus kockázata miatt a két funkció-vesztő *CYP2C9* allélt hordozó betegeknél kizárólag alternatív antiepileptikum terápiát (pl. lamotrigin) alkalmaztak. A PharmVar adatbázis (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>) szerint a *CYP2C9*\*1/\*1 genotípus alapján normál *CYP2C9* enzimaktivitás becsülhető, azonban a homozigóta vad genotípusú gyermekeknél azt tapasztaltuk, hogy a valproát-lebontó képességet a *CYP2C9* expresszió szignifikánsan befolyásolta (**D25**). Alacsony *CYP2C9* mRNS expressziójú betegeknél a dózis/testtömeggel normalizált valproát vérszint sokkal inkább a heterozigóta (*CYP2C9*\*1/\*2, *CYP2C9*\*1/\*3 genotípusú) betegek magas vérszintjéhez volt hasonló, míg az intermedier *CYP2C9* expresszió a genotípus alapján várható normál valproát-metabolizmust tükrözte (29.A ábra). Ugyanakkor a heterozigóta, polimorf *CYP2C9* allélt hordozó betegek valproát-lebontó képessége nem függött a *CYP2C9* mRNS expressziótól.

A *CYP2C9* fenokonverzióját és a valproát-metabolizáló képesség megváltozását a párhuzamosan alkalmazott gyógyszeres kezelés (pl. *CYP2C9* induktor hatású vegyületek, mint a karbamazepin vagy a fenobarbitál; *CYP2C9* enzimet gátló hatóanyagok, flukonazol, mikonazol), esetleg maga a megbetegedés is okozhatja. A vizsgálatainkban részt vevő kisbetegek monoterápiában kapták a valproátot, ezért a gyógyszeres kezelések okozta *CYP2C9* aktivitás-változást kizárhattuk. Az epilepsziás rohamok során felszabaduló szuppresszív faktorok, mint a gyulladáscsökkentő citokinek azonban okozhattak *CYP2C9* expresszió csökkenést (Yu 2012; Uludag 2013; Aitken 2007). Az IL-6-ról (interleukin-6) és IL-1 $\beta$ -ről ismert, hogy negatívan befolyásolják a PXR és CAR nukleáris receptorok transzkripcióját, ami magyarázatot jelent a *CYP2C9* expresszió mérséklődésére (Pascussi 2000 és 2003b). Ezt támasztotta alá, hogy a *CYP2C9*-státusz vizsgálatot megelőző 72 órában az alacsony *CYP2C9* expressziójú betegeknél messze gyakrabban regisztráltunk epilepsziás rohamot, mint az intermedier vagy magas *CYP2C9* expressziót mutató betegeknél (54,5% vs 9,4%,  $P < 0,0001$ ) (**D26**).

A valproát terápia beállítása különös gondosságot igényel, amely abból fakad, hogy a valproát szűk terápiás indexű hatóanyag, ezért az alacsony kezdő dózis (10-15 mg/kg) fokozatos, akár több héten keresztül tartó emelésével javasolt a terápiás hatáshoz szükséges, a rohamot szabályozni képes fenntartó dózist elérni a mellékhatások elkerülése mellett. A betegek valproát-metabolizáló képességének becslése segítséget jelenthet a kezelőorvos számára, hiszen a vérszint ellenőrzésére általában csak a terápia megkezdését követően egy hónap múlva kerül sor. A gyermekek *CYP2C9*-státusza és a valproát terápia vérszintje (dózis/testtömeggel normalizált) között kimutatott szoros összefüggés alkalmas volt fenntartó dózis megállapítására (8. táblázat) (**D25**).

8. táblázat: CYP2C9-státusz alapján gyermekeknél javasolható valproát terápia

<b>CYP2C9 genotípus</b>	<b>CYP2C9 mRNS expresszió</b>	<b>Valproát céldózis</b>
<i>CYP2C9mut/mut<sup>a</sup></i>	-	alternatív terápia
<i>CYP2C9*1/mut<sup>a</sup></i>	-	csökkentett dózis: 10-20 mg/kg
<i>CYP2C9*1/*1</i>	alacsony	csökkentett dózis: 10-20 mg/kg
	intermedier	átlagos dózis: 30-40 mg/kg
	magas	emelt dózis: >40 mg/kg

<sup>a</sup>mut: *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*

A gyermekek CYP2C9-státuszához igazított valproát kezelés előnyeit is elemeztük a tünet-alapú kezeléssel szemben (D26). A kontroll betegcsoportban (N=47) a valproát terápia beállítása óvatos dózis-emeléssel (20-40 mg/kg-ig), a roham-mentesség mellett a mellékhatás tünetek szigorú megfigyelésével történt. Míg a CYPtest csoport betegeinél (N=52) előzetesen meghatároztuk a *CYP2C9* genotípust és a *CYP2C9* expressziót, majd a valproát terápia elrendelése és a céldózis megállapítása a 8. táblázat szerint zajlott. A *CYP2C9*-státusz alapján kezelték közül 1 betegnél alternatív terápiára volt szükség, míg a valproát terápián lévő betegek 74,5%-ánál csökkentett dózist, 23,5%-ánál átlagos dózist és 1 betegnél emelt dózist alkalmaztunk. Az első hónapos valproát vérszint ellenőrzés megállapította, hogy az átlag valproát vérszint nem különbözött a két csoportnál, azonban a *CYP2C9*-státusz alapú valproát dozírozással számottevően kevesebb betegnél alakult ki terápiás koncentráció tartományon (40-100 µg/ml) kívüli vérszint, mint a kontroll csoport betegeinél (CYPtest: 17,6%, N=51; kontroll: 44,7%, N=47, P=0,004), másrészt a terápiás koncentrációtól való eltérés is szignifikánsan kisebb volt (CYPtest: 2,98±1,90 µg/ml; kontroll: 21,2±16,17 µg/ml, P<0,001). Az egy hónapos valproát kezelés nem okozott változást a vörösvértest, fehérvérsejt és vérlemezke számban, azaz csontvelő-szuppresszióra utaló jelet nem figyeltünk meg egyik csoportban sem. Azonban a tünetek alapján kezelt csoportban az alkalikus foszfatáz szérumszintje szignifikánsan növekedett a *CYP2C9*-státusz alapján kezelt csoporthoz képest; a kontroll betegek felénél a normál határértéket meghaladó alkalikus foszfatáz szinteket mértünk (kontroll: 23/47 vs CYPtest: 2/51, P<0,001). Az alkalikus foszfatáz szint emelkedése csont-anyagszere zavart vagy májkárosodást jelezhet. Tekintve, hogy a szérumban a kalcium és foszfor szint a normális tartományban volt minden betegnél, a csont-anyagszere zavar lehetőségét elvetettük. A máj-funkciót jellemző paraméterek (szérumszint transzaminázok, γ-glutamil transzferáz) szintén a normál tartományban voltak egyetlen kivétellel, a kontroll csoportban gyakrabban fordult elő hiperammonémia (kontroll: 8/47 vs CYPtest: 1/51, P=0,01). A szérumszint ammónia szint kóros megemelkedése, amely a máj urea ciklusának zavarát jelzi, minden esetben extrém magas

alkalikus foszfatáz szinttel (>750 U/l, sőt előfordultak >1200 U/l értékek is), magas valproát vérszinttel (>100 µg/ml) és olyan másodlagos tünetekkel társult, mint az émelygés, hányás, étvágy-csökkenés, álmoság, zavartság, lelassult állapot vagy eszmélet-vesztés. Összegezve megállapíthattuk, hogy gyermekeknél a CYP2C9-státuszhoz igazított valproát dozírozás nemcsak a terápiás vérszint precízebb beállítását, de a hibás dozírozásból származó mellékhatások csökkentését is lehetővé tette.

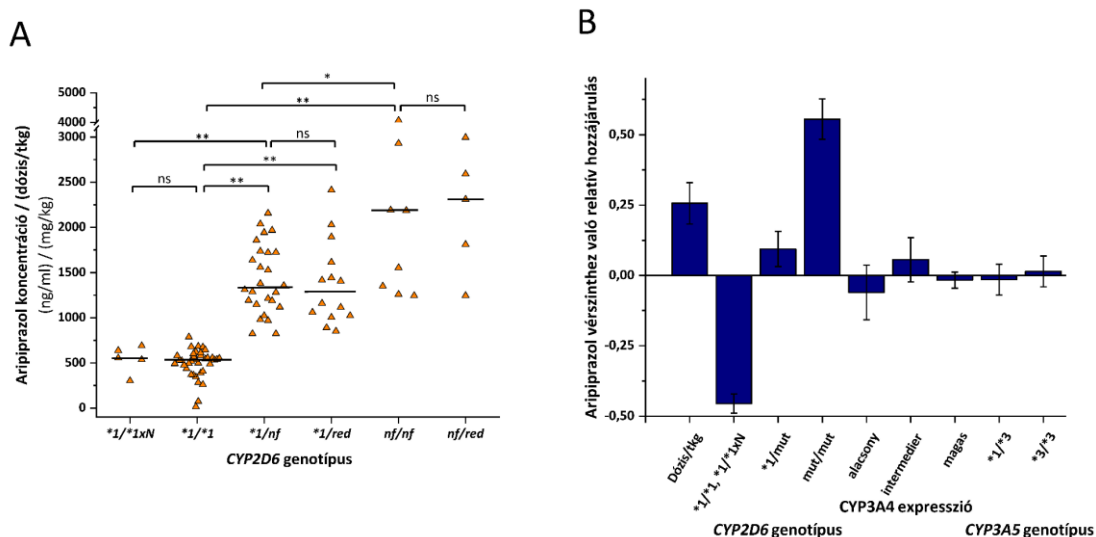
#### 4.3.5 CYP enzimek szerepe pszichiátriai betegek pszichofarmako-terápiájában (D27-29)

A szkizofrénia az egyik legsúlyosabb mentális megbetegedés, amelyet érzékcsalódások és téveszmék (pozitív tünetek), valamint érzelmi eltompulás, kommunikációs elsivárosodás (negatív tünetek), továbbá rendezetlen gondolkodás és beszéd, viselkedési zavar jellemez (Owen 2016). Terápiájának legfőbb célja a pszichotikus tünetek csökkentése, megszüntetése és a tartós pszichés egyensúly elérése, amely nem képzelhető el antipszichotikumok nélkül (Kovács 2011). Az aripiprazol és a klozapin második generációs antipszichotikumok, amelyek hatékonyan csökkentik a pozitív és negatív tüneteket, ugyanakkor a mellékhatások kockázata nem elhanyagolható, amelyek főként magas vérkoncentrációnál jelentkeznek. A gyakoribb mellékhatások között kell említeni a testsúly gyarapodást, vércukor-szint emelkedést, a kábultságot és szédülést, fokozott nyáltermelést, hányingert és a székrekedést. Inkább az aripiprazolra jellemző, hogy extrapiramidális tüneteket (akaratlan izomrángás, rángatózó mozgás), nyugtalanságot és fokozott mozgáskényszert okozhat, míg a klozapinhoz köthető mellékhatások a granulocita fehérvérsejtszám csökkenése és a görcsrohamok előfordulása (Swainston Harrison 2004; Kane 2009; Casey 2017; Yusufi 2007; Wenthur 2013).

Az **aripiprazol** metabolizmusának fő útvonala a farmakológiailag aktív dehidroaripiprazol képződéséhez vezet, míg minor metabolikus útvonalnak tekinthető az aripiprazol hidroxilezése, illetve az anyavegyület ketté hasadása (*N*-dezalkilezés), amely inaktív metabolitokat eredményez (Függelék 12.8) (Kirschbaum 2008). Az *in vitro* vizsgálatok feltárták a CYP2D6 és CYP3A4 enzimek szerepét az aripiprazol átalakításában (Swainston Harrison 2004), amelyből a betegeknél jelentős inter-individuális aripiprazol vérszint különbségekre következtethetünk. A *CYP2D6* polimorf allélok enzimaktivitást befolyásoló hatása jól ismert (ld. 4.2.1), míg a CYP3A enzimaktivitás különbségek inkább a CYP3A4 expresszió nagyfokú eltéréseire vezethetők vissza. Bár nem szabad megfeledkezni arról, hogy a CYP3A5 bizonyos CYP3A-szubsztrátok metabolizmusában domináns szerepet tölthet be és a *CYP3A5* genotípus jelentős meghatározó tényező lehet (pl. takrolimusz, ld. 4.3.3). Stabil aripiprazol terápián lévő pszichiátriai betegeknél (N=93) összefüggést kerestünk az aripiprazol-metabolizáló képesség és a betegek CYP3A-

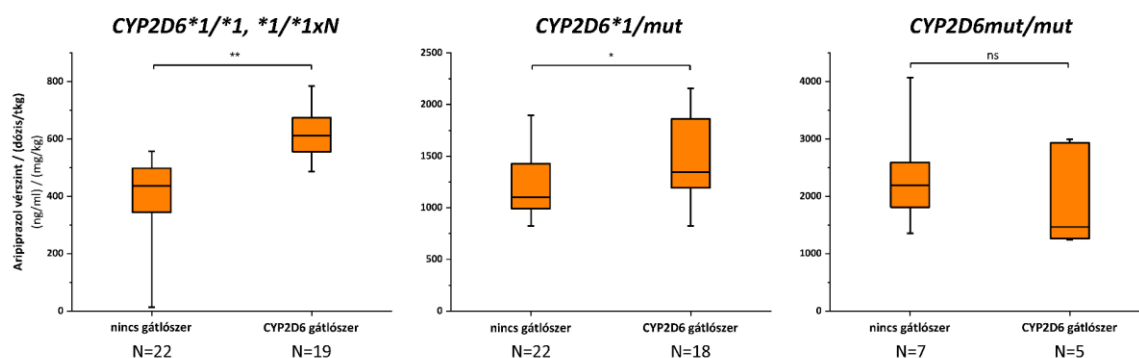


státusza, valamint *CYP2D6* genetikai variabilitása között, továbbá elemeztük a párhuzamosan alkalmazott potenciális *CYP2D6*-gátló hatóanyagok fenokonverziós hatását is (D27). Az aripiprazol dózis/testtömeggel normalizált vérszintje és a betegek *CYP2D6* genotípusa között szoros összefüggést találtunk (30.A ábra); a null-aktivitáshoz, illetve csökkent enzimaktivitáshoz vezető *CYP2D6* allélt (*CYP2D6\*1/nf*, *CYP2D6\*1/red*, *CYP2D6nf/nf*, *CYP2D6nf/red*) hordozó betegeknél magasabb vérszintek alakultak ki, mint a kizárólag vad-típusú allélt hordozóknál (*CYP2D6\*1/\*1*, *CYP2D6\*1/\*1×N*). Szignifikáns vérszint különbségeket találtunk az egy (*CYP2D6\*1/nf*, *CYP2D6\*1/red*) és két polimorf allélt (*CYP2D6nf/nf*, *CYP2D6nf/red*) hordozó betegek aripiprazol koncentrációjában is, azonban a null-aktivitást (*CYP2D6nf*) és csökkent enzimaktivitást (*CYP2D6red*) eredményező *CYP2D6* allélok hasonlóan befolyásolták az aripiprazol vérszintet, ezért a továbbiakban nem tettünk különbséget a funkció-vesztő polimorf allélok között (*CYP2D6mut*). A homozigóta vad genotípusú betegek (*CYP2D6\*1/\*1*) vérkoncentrációja szintúgy nem különbözött a duplikációt/multiplikációt hordozó (*CYP2D6\*1/\*1×N*) betegektől. A fő metabolit dehidroaripiprazol képződését is szignifikánsan befolyásolta a betegek *CYP2D6* genotípusa; a *CYP2D6\*1* vad-típusú allélt 2 vagy több kópiában hordozó betegeknél a dehidroaripiprazol koncentrációja összemérhető volt az anyavegyületével, míg a dehidroaripiprazol/aripiprazol arány számottevően kisebb volt a polimorf *CYP2D6* allélt hordozó betegeknél. A dehidroaripiprazol képződésében mérsékelt, de szignifikáns eltérést találtunk a polimorf allélt 1 vagy 2 kópiában hordozó betegek között (részletek a D27 publikációban).



30. ábra: Pszichiátriai betegek **aripiprazol** vérszintjét befolyásoló tényezők. A) A *CYP2D6* genotípus szignifikánsan hatott az aripiprazol vérszintre. B) A vérszintet meghatározó genetikai és nem-genetikai tényezők relatív szerepe (főkomponens analízis). *nf* null-aktivitást eredményező *CYP2D6* allélvariánsok (\*3, \*4, \*5, \*6 és \*4×N); *red* csökkent működőképességű enzimet eredményező variánsok (\*10 és \*41); *mut* *CYP2D6 nf* és *red* variánsok; \*P<0,01; \*\*P<0,0001; ns nem szignifikáns

A betegek CYP3A enzimaktivitását a CYP3A4 mRNS expresszió alapján becsültük, ugyanis a csökkent, illetve fokozott CYP3A4 expresszióval összefüggésbe hozott *CYP3A4\*22* és *CYP3A4\*1B* allélok előfordulási gyakorisága (13/93) nem magyarázta a betegeknél tapasztalt óriási expressziós különbségeket. A CYP3A4 expresszió szerepét azonban nem sikerült igazolni sem az aripiprazol vérszint kialakulásában, sem a dehidroaripiprazol metabolit képződésében, még a *CYP3A5* genotípus figyelembevételével sem. Az aripiprazol vérszint kialakításában meghatározó faktorok azonosítása főkomponens analízissel megerősítette a *CYP2D6* genotípus kiemelt jelentőségét (30.B ábra). A *CYP2D6* domináns szerepe azt is jelenti, hogy az aripiprazol farmakokinetikai viselkedése érzékeny a *CYP2D6* fenokonverziót előidéző hatóanyagokra, amelyek szintén hozzájárulhatnak az aripiprazol vérszint variabilitásához. A betegek multidrog terápiájában gyakorta előforduló risperidon, metoprolol és propranolol *CYP2D6* szubsztrátok, amelyek *in vitro* *CYP2D6* gátlószerként viselkednek (Prakash 2000; Yamamoto 2003). A párhuzamosan alkalmazott risperidon, metoprolol vagy propranolol kezelés aripiprazol vérszint emelkedést idézett elő azoknál a betegeknél, akik legalább egy vad-típusú *CYP2D6\*1* allélt hordoztak (31. ábra).



31. ábra: A párhuzamosan alkalmazott *CYP2D6*-gátló gyógyszerek (risperidon, metoprolol, propranolol) hatása a betegek **aripiprazol** vérszintjére. Jelöltem az egyes csoportokban lévő betegek számát (N).

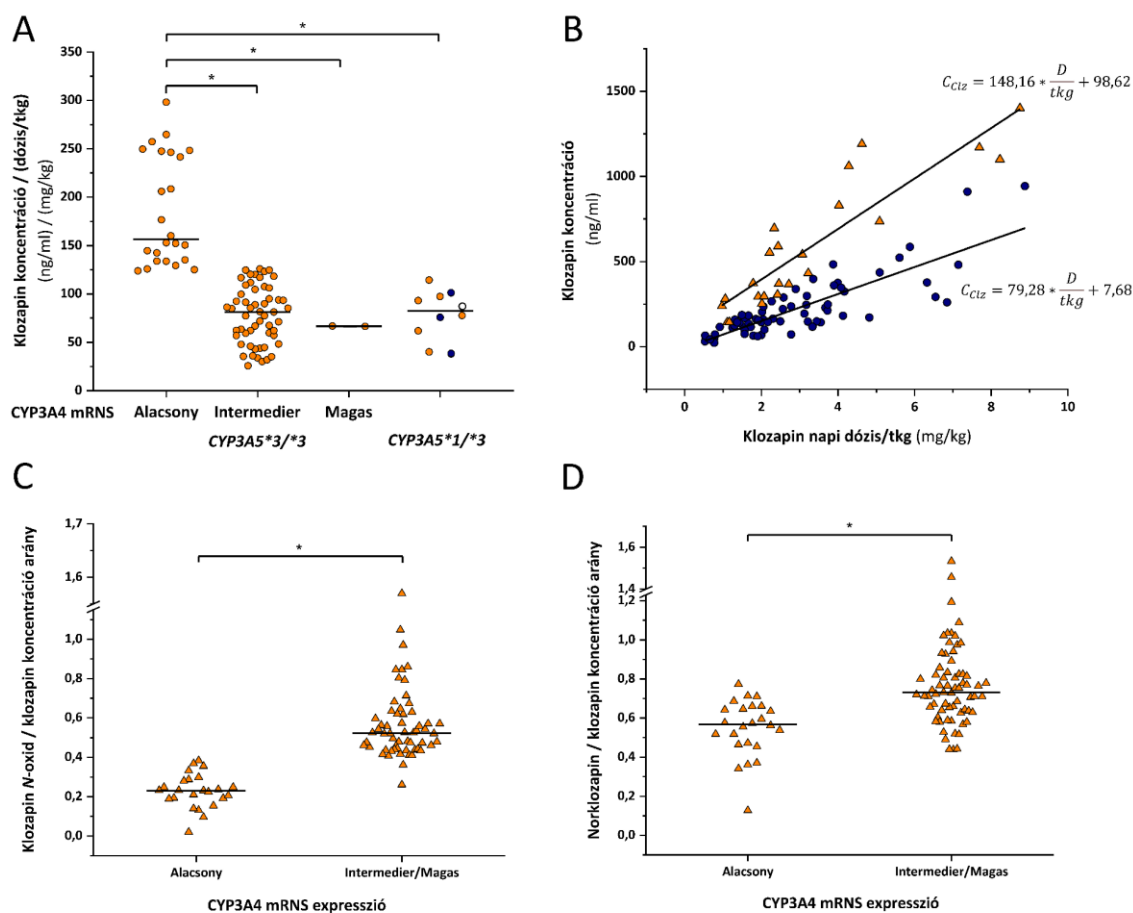
*mut* funkció-vesztő *CYP2D6* allél; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,0001$ ; ns nem szignifikáns

*In vitro* körülmények között kimutattuk, hogy humán máj mikroszómában a risperidon, sőt metabolitja a 9-hidroxi-risperidon is gátolta mind a dehidroaripiprazol, mind a hidroxi-aripiprazol képződését. A 9-hidroxi-risperidon által kiváltott gátlás mértéke hasonló volt az anyavegyületéhez (dehidroaripiprazol képződés gátlása: risperidon  $K_i$   $8,4 \pm 2,64 \mu\text{M}$ , 9-hidroxi-risperidon  $K_i$   $9,3 \pm 2,97 \mu\text{M}$ ; hidroxi-aripiprazol képződés gátlása: risperidon  $K_i$   $9,1 \pm 1,70 \mu\text{M}$ , 9-hidroxi-risperidon  $K_i$   $13,9 \pm 0,26 \mu\text{M}$ ), azaz a risperidon metabolizmusával nem szűnik meg a *CYP2D6*-gátló hatás. A 9-hidroxi-risperidon paliperidon néven szintén forgalomban van (Alamo 2013), ezért a paliperidon párhuzamos alkalmazása várhatóan szintén aripiprazol vérszint emelkedéshez vezet. A metoprolol és a propranolol ugyanakkor csak a farmakológiailag aktív dehidroaripiprazol

képződését blokkolta és így az aripiprazol metabolizmusát az inaktiválódást eredményező útvonalak felé terelte. Az aripiprazol terápia magas akathisia (nyughatatlanság, kényszeres mozgás) mellékhatás kockázattal jár, amelyet  $\beta$ -adrenerg receptor gátlószerekkel, mint a metoprolol és a propranolol, kezelnek (Thomas 2015; Miller 2000). Az aripiprazol +  $\beta$ -adrenerg receptor gátlószer együttes kezelése általános a pszichiátriai gyakorlatban, amely a CYP2D6 interakciós eredményeink klinikai jelentőségét húzza alá. A risperidon, metoprolol vagy propranolol párhuzamos terápia az emelkedett aripiprazol vérszintek (>300 ng/ml) előfordulási gyakoriságát is megnövelte, amellyel együtt jár a súlyos és közepesen súlyos mellékhatások kockázatának növekedése is.

A **klozapin** az aripiprazolhoz hasonlóan intenzív átalakuláson megy keresztül, a metabolizmus során két fő metabolit, a norklozapin és a klozapin *N*-oxid képződik (Függelék 12.9). A norklozapin farmakológiailag aktív, így hozzájárul a klozapin antipszichotikus hatásához (Lameh 2007), míg a klozapin *N*-oxid képződés az inaktiválási útvonalat jelenti. Az *in vitro* metabolizmus vizsgálatok több CYP enzim (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6) és a flavin monooxygenáz szerepét is kimutatták a klozapin átalakításában (Fang 1998; Olesen 2001), azonban az egyes enzimek klinikai jelentősége a klozapin lebontásában sok szempontból bizonytalan képet mutat. Az *N*-oxid metabolit képződéséért elsősorban a CYP3A4 enzimet teszik felelőssé és a flavin monooxygenáz 3 katalitikus aktivitását is megemlíti (Fang 1998). A klozapin *N*-demetilizálásában (norklozapin képződés) a CYP1A2 és CYP3A4 szerepét hangsúlyozzák, főként indirekt bizonyítékok alapján (a CYP1A2, CYP2C19 és CYP3A4 aktivitást befolyásoló fluvoxamin gátolta a norklozapin képződést a betegekben; a CYP1A2 indukciót kiváltó dohányzás pedig fokozta a klozapin eliminációt) (Lu 2000; van der Weide 2003). A CYP2C19 és CYP2D6 enzimek hozzájárulása a norklozapin képződéshez azonban nehezen megítélhető. Stabil klozapin kezelés alatt álló pszichitriai betegeknél (N=92) igyekeztünk tisztázni a *CYP2C19*, *CYP2D6* és *CYP3A5* genetikai variabilitás, valamint a CYP1A2 és CYP3A4 expresszió szerepét a betegek klozapin-metabolizáló képességének (klozapin és a fő klozapin-metabolitok vérszintjének) kialakításában (**D28**). A betegek dózis/testtömeggel normalizált klozapin vérszintje nem mutatott összefüggést a *CYP2C19* polimorf allélvariánsokkal, ahogy a *CYP2D6* allélvariánsokkal sem, ezért ezen CYP enzimek klinikai jelentőségét a klozapin átalakításában elhanyagolhatónak tekintettük (részletek a **D28** publikációban). A betegek leukocitáiban mérhető CYP1A2 mRNS szint alapján jellemeztük a CYP1A2 metabolizáló képességet, mivel a leukocita CYP1A2 expresszió jól tükrözi a máj CYP1A2 enzimaktivitását (**D20**, 4.3.1). Az alacsony és intermedier CYP1A2 expresszáló betegeknél azonban nem volt kimutatható különbség a normalizált klozapin vérszintekben, így nem tudtuk megerősíteni a CYP1A2 domináns szerepét a klozapin metabolizmusában.

Ugyanakkor a CYP3A4 enzim klozapin átalakításában betöltött szerepe előtérbe került; az alacsony CYP3A4 expressziójú betegeknél szignifikánsan magasabb normalizált klozapin vérszintek alakultak ki, mint az intermedier vagy magas CYP3A4 mRNA expressziót mutató betegeknél (32.A ábra). Elsőként mutattuk ki továbbá a CYP3A5 jelentőségét is; a vad-típusú *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél alacsony normalizált klozapin vérszintek jelentkeztek függetlenül a CYP3A4 expresszió mértékétől (32.A ábra). A CYP3A enzimek aktivitása a klozapin metabolizmusában feltehetőleg azért juthatott érvényre, mert a betegek nagy része



33. ábra: A CYP3A-státusz (CYP3A4 expresszió és a *CYP3A5* genotípus) hatása a **klozapin** vérszintre, valamint a metabolit/klozapin arányra pszichiátriai betegeknél. A) Dózis/testtömeeggel normalizált klozapin vérszint alacsony, intermedier és magas CYP3A4 expressziójú, valamint *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél (○magas CYP3A4 expressziójú, ●alacsony CYP3A4 expressziójú beteg); B) az alacsony (▲) és intermedier/magas CYP3A4 expressziójú (●) betegek klozapin dózis - vérszint összefüggései; C) a klozapin N-oxid/klozapin arány, D) és a norklozapin/klozapin arány eltérő CYP3A4 expressziójú betegeknél;  $C_{Clz}$  klozapin vérszint,  $D$  dózis,  $tkg$  testtömeg, \* $P < 0,0001$

(70,7%) alacsony CYP1A2 expressziójú volt, amely alacsony CYP1A2 aktivitást takar, és csak kevesebb mint egy harmaduknál mérhettünk intermedier CYP1A2 mRNA koncentrációkat. A pszichiátriai betegek nagy része dohányzik, ami a CYP1A2 indukcióját és a CYP1A2 expresszió

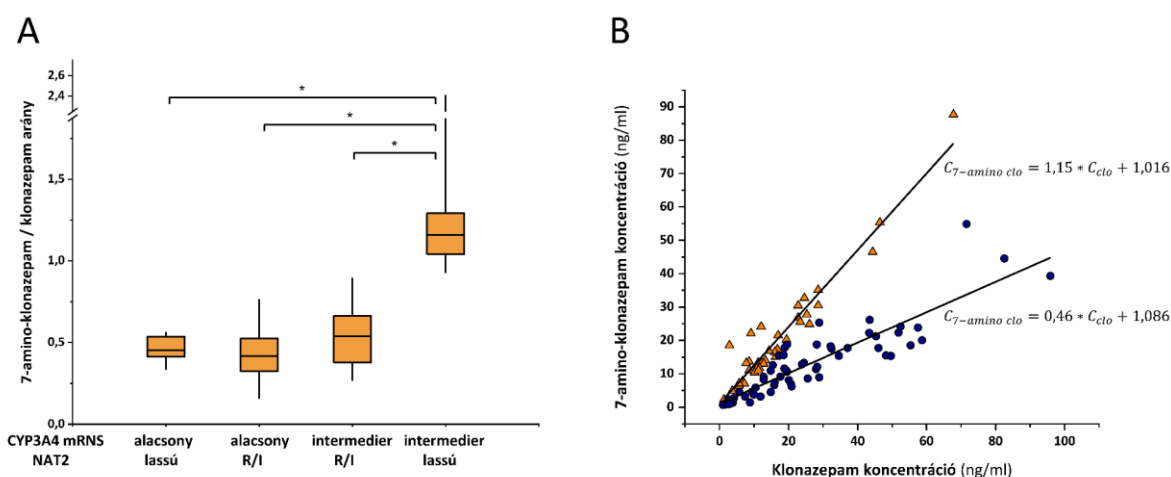
emelkedését idézheti elő (Leon 2005), azonban a jelen vizsgálatba bevont betegek mindössze 38%-a volt dohányos és közülük csak 4 volt nagydohányos ( $\geq 1$  doboz/nap). Ezzel szemben a CYP3A4 intermedier és magas expressziójú, valamint a *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegek aránya 74% volt. Így a CYP3A enzimek relatív jelentősége a klozapin metabolizmusában megnőtt a CYP1A2-vel szemben.

A klozapin napi dózisa és a normalizált vérszint közti összefüggés elemzése során két modellt állítottunk fel, a CYP3A4-et alacsony és a nem-alacsony szinten expresszáló betegekre, akiknél hozzávetőlegesen 2-szeres normalizált vérszint különbséget mutattunk ki ( $k_I = 148,16$  vs  $79,28$ ) (32.B ábra). A terápiás vérszintet (200-600 ng/ml) mutató betegeknél alkalmazott klozapin dózis alapján megállapítottuk, hogy az optimális vérszint eléréséhez szignifikánsan magasabb (kb. 2-szeres) dózusra volt szüksége a CYP3A4 intermedier/magas expresszálóknak és a *CYP3A5\*1* hordozóknak, mint a CYP3A4 alacsony expresszálóknak ( $2,18 \pm 0,64$  mg/kg vs  $4,98 \pm 1,4$  mg/kg,  $P < 0,0001$ ) (részletek a **D28** publikációban). A betegek CYP3A-státusza úgy gondoljuk, segítheti az optimális klozapin vérszinthez szükséges céldózis meghatározását, már akár a terápia megkezdésekor, ami különösen előnyös lehet, hiszen a klozapin adagolás óvatos felépítése, a céldózis elérése hosszú időbe, gyakran hetekbe telik. A két fő klozapin metabolit, a klozapin *N*-oxid és a norklozapin képződése szintén összefüggést mutatott a betegek CYP3A4 expressziójával (32.C és D ábra). Az intermedier és magas CYP3A4 expresszió fokozott metabolit termeléssel társult olyannyira, hogy a klozapin metabolitok vérszintje összemérhető volt az anyavegyület koncentrációjával. Magas norklozapin koncentrációval hozható összefüggésbe a testtömeg-gyarapodás és a görcsrohamok fokozott kockázata, mivel a norklozapin erősebb 5-HT<sub>2C</sub> (szerotonin 2C) receptor antagonistája, mint a klozapin (Lu 2004; Polcwiartec 2016). Azaz a fokozott norklozapin képződés ugyanúgy megnövekedett mellékhatás kockázattal járhat, mint a terápiás koncentrációt meghaladó klozapin vérszint.

A **klonazepam** a benzodiazepinek közé tartozik, amelyet görcsgátló sajátossága miatt eredetileg antiepileptikumként hoztak forgalomba, azonban pszichiátriai zavarok terápiajában is jól alkalmazható szorongás, pánikrohamok, kóros izgalmi állapotok kezelésére (Nardi 2006; Riss 2008; Mendonca Júnior 2015). A legtöbb beteg alapvetően jól tolerálja, azonban előfordulhatnak olyan nem-kívánt hatások, mint szédülés, aluszékonyság, zavartság, amelyek főként idős korban jelenthetnek problémát az elesésekből fakadó sérülések miatt (Pariente 2008). A hosszan tartó klonazepam kezelés hozzászokáshoz vezethet, illetve a kezelés leállítása megvonási tüneteket (remegés, izzadás, fejfájás, szédülés, görcsroham) eredményezhet (Chouinard 2004). A klonazepam metabolizmus fő útvonala a CYP3A4 enzim által katalizált nitro-redukció, amely a 7-amino-klonazepam képződéséhez vezet; a 7-amino-klonazepam tovább alakulását, acetil-

konjugációját *N*-acetamido-klonazepammá pedig az *N*-acetyl transferáz 2 (NAT2) végzi (Függelék 12.10) (Olivera 2007). A NAT2 aktivitását a jellemzően nagyfokú genetikai polimorfizmus befolyásolja, amely a lassú vagy gyors acetilátor fenotípusért felelős (Hein 2009 és 2021). A NAT2\*4 allélt tekintjük vad-típusú allélnak, amely a gyors acetilátor fenotípus kialakulásért felelős, míg a kaukázusi populációban gyakran előforduló NAT2\*5, NAT2\*6 és NAT2\*7 allélok a lassú acetilátor fenotípust hozzák létre (McDonagh 2014). A 7-amino-klonazepam farmakológiailag ugyan inaktív, azonban képes a benzodiazepin receptorhoz kötődni, és mivel a vérszintje összemérhető az anyavegyületével, képes leszorítani a klonazepamot a receptorról. Így a 7-amino-klonazepam gyengítheti, vagy az anyavegyülethez képest magas koncentrációban fel is függesztheti a klonazepam hatását, amely súlyos megvonási tünetek kialakulásához vezethet.

Pszichiátriai betegeknél (N=98) megkíséreltük azonosítani a klonazepam-metabolizáló képességet befolyásoló, valamint a 7-amino-klonazepam felhalmozódásához vezető tényezőket, mint a CYP3A4 expresszió, a CYP3A5 genetikai polimorfizmus vagy a gyors és lassú acetiláló fenotípus hátterében lévő NAT2 genetikai variabilitás (D29). Nagy meglepetést nem jelentett, hogy a betegek dózis/testtömeggel normalizált klonazepam vérszintje szoros összefüggést mutatott a máj CYP3A4 aktivitását tükröző CYP3A4 expresszióval. Meg kell jegyezni azonban, hogy a vad-típusú CYP3A5\*1 allél, valamint a NAT2 genotípus nem módosította a klonazepam vérkoncentrációját. A klonazepam dózis és vérszint összefüggésre felállított modellek az alacsony



33. ábra: A CYP3A4 expresszió és NAT2 acetilátor fenotípus hatása a **7-amino-klonazepam** vérkoncentrációra pszichiátriai betegeknél. A) A 7-amino-klonazepam/klonazepam vérszint arány különböző CYP3A4 expressziójú és NAT2 acetilátor fenotípusú betegeknél; B) a 7-amino-klonazepam – klonazepam vérszint lineáris modellje CYP3A4 intermediér expressziójú lassú acetiláló betegeknél (▲) és minden más CYP3A4-NAT2 betegeknél (●). R/I gyors/intermediér acetiláló fenotípus;  $C_{clo}$  klonazepam vérszint,  $C_{7\text{-amino clo}}$  7-amino-klonazepam vérszint; \* $P < 0,0001$

és intermedier/magas CYP3A4 expressziójú betegeknél nagyjából 2-szeres vérszint különbséget jeleztek ugyanakkora dózisinál ( $k_I=953,2$  vs  $538,7$ ). Az alacsony CYP3A4 expressziót mutató betegeknek hozzávetőlegesen 50%-al alacsonyabb klonazepam dózisa volt szükségük a terápiás vérkoncentráció kialakulásához, mint az intermedier/magas expressziójú betegeknél (részletek a **D29** publikációban). Elsőként mutattuk ki, hogy a 7-amino-klonazepam felhalmozódik azoknál a betegeknél, akik CYP3A4 intermedier expressziójúak és NAT2 lassú acetiláló fenotípusúak (33.A ábra). A 7-amino-klonazepam vérszint és a CYP3A4 expresszió, valamint a NAT2 fenotípus összefüggés vizsgálatára két modellt állítottunk fel: 1) a CYP3A4 intermedier expressziójú + NAT2 lassú acetiláló fenotípusú betegekre és 2) a többi 3 kombinációval jellemezhető betegekre (alacsony CYP3A4 expressziójú betegek, valamint intermedier CYP3A4 expresszió + gyors/intermedier acetiláló fenotípusú betegek) (33.B ábra). A lineáris modellek alapján megállapíthattuk, hogy az intermedier CYP3A4 expressziójú, lassú NAT2 acetiláló fenotípusú betegeknél hasonló vagy az anyavegyületet meghaladó 7-amino-klonazepam koncentrációra lehet számítani, ami az összes többi betegnél várható vérszint arány jó 2-szerese ( $k_I=1,15$  vs  $0,46$ ). A betegek nagyobbik hányada (77,5%) intermedier vagy magas CYP3A4 expressziót mutatott, míg hozzávetőlegesen a fele NAT2 lassú acetiláló fenotípusú volt, így a klonazepam vérszinthez viszonyítva magas 7-amino-klonazepam koncentráció 35-40%-uknál előre becsülhető volt (38/98), ami nem elhanyagolható a klonazepam hatékonyság és a mellékhatás kockázat szempontjából.

#### 4.3.6 KÖVETKEZTETÉSEK

A személyre szabott terápia kialakításának célja, hogy a beteg számára optimális, alacsony gyógyszerterheléssel járó, hatékony kezelési módot válasszunk, egyben törekedve a mellékhatások elkerülésére, de legalábbis minimalizálására. A betegek gyógyszer-metabolizáló képességében mutatkozó tekintélyes eltérések felismerése farmakogenetikai vizsgálatok sorát indította el, amely feltárta a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó enzimek genetikai polimorfizmusai és az eltérő hatóanyag-metabolizmus közti összefüggéseket. Az eltérések azonban csak részben írhatók a genetikai polimorfizmus számlájára. Ahogy azt a 4.2.1 fejezetben bemutattam, a nem-genetikai tényezők CYP enzim expressziót és működést módosító hatása jelentős mértékben megváltoztathatja a CYP genotípus alapján becsülhető fenotípust. A CYPtest<sup>TM</sup> diagnosztikai eljárással a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő CYP enzimek aktivitását befolyásoló genetikai polimorfizmusok, valamint az aktuális leukocita CYP expresszió mértéke alapján becsüljük a CYP enzimek fenotípusát (enzimaktivitását) (**D20**). Számos szerző és egészségügyi szervezet üdvözölte a megközelítést, az ígéretes, új biomarker csomagnak tekintett eljárásban lehetőséget látva a gyógyszer-hatóanyagok optimális dózisának meghatározására (Niklas 2013; Friede 2015;

Musunuru 2017; Hiemke 2018; Fanni 2021). A betegeknel végzett CYP-statusz felmérés valóban lehetőséget nyújtott arra, 1) hogy a megváltozott gyógyszer-metabolizáló képességű betegeket beazonosítsuk, 2) hogy számos hatóanyag dozírozására, így személyre szabott terápiájára javaslatot tegyünk, 3) sőt hogy a CYP-statusz alapján beállított gyógyszeres kezelés előnyeit is kielemezzük.

Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegeknel a drasztikusan alacsony CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 expresszió (**D21**) közvetlen bizonyítékot szolgáltatott a vese-betegeknel megfigyelt, CYP enzimekhez köthető romló gyógyszer-metabolizmusra. A csökkent gyógyszer-metabolizáló képesség a vesebetegek gyógyszeres kezelése során a túladagolás kockázatát is fokozza, ezért megfontolandó a gyógyszer-dózisok csökkentése (Roberts 2018). A vesepótló kezelések közül a vesetranszplantáció jelentős és stabil javulást hozhat a máj gyógyszer-metabolizáló CYP aktivitásában azzal, hogy az urémiás toxinok eltűnnek a keringésből, azonban a szakaszosan végzett dialízis további bonyodalmakat teremthet. Ugyanis maga a dialízis a toxinok eltávolításával időszakosan javítja a CYP expressziót és aktivitást, de a gyógyszer-metabolizáló képességben bekövetkezett javulás mértéke és időtartama nehezen becsülhető (Momper 2010; Roberts 2018).

Szervátültetésen átesett betegek immunszuppresszív terápiájának részét képezi a ciklosporin vagy takrolimusz kezelés, amely a beteg egész életén át tart, ezért a jelentős eltéréseket kiváltó genetikai és nem-genetikai tényezőket, valamint a veszélyeztetett betegeket igencsak létfontosságú azonosítani. A CPIC külön ajánlásban foglalkozik a *CYP3A5* genotípushoz igazított takrolimusz terápia kérdésével (<https://cpicpgx.org/guidelines/guiedline-for-tacrolimus-and-cyp3a5>), amely azonban csak a vad-típusú *CYP3A5\*1* allélt hordozóknak, a betegek kis hányadának (a kaukázusi fehér populációban kb. 10%-nak) javasol megnyugtató adagolási megoldást. Májtranszplantált betegeknel a donor máj CYP3A-statusza alapján mind a ciklosporin, mind a takrolimusz dózisának módosítására tettünk javaslatot (**D22**). Mindkét kalcineurin inhibitor kezdő dózisának 50%-os csökkentésére volt szükség az alacsony CYP3A4 expressziójú (*CYP3A5\*3/\*3* genotípusú) májgrafttal transzplantált betegeknel, míg a magas CYP3A4 expresszió vagy a *CYP3A5\*1* allél jelenléte a terápiás vérszint kialakulásához szükséges dózis emelését igényelte. A napi dózis emelésének mértéke azonban eltérő volt a két hatóanyagnál, a ciklosporin kezdő dózisának 30-40%-os emelése, míg a takrolimusz kezdő dózisának 2-szeresre történő emelése eredményezett terápiás vérkoncentrációt. A kalcineurin inhibitor vérszintet előre jelző CYP3A-statusz értékét a céldózis meghatározásában külön kiemelték Herrero és munkatársai (2016) összefoglaló munkájukban. Különbséget találtunk azonban a máj- és szív-transzplantált betegek számára javasolható takrolimusz dózis-módosításban (**D22**, **D23**). A májátültetésen átesett betegek



60%-ánál (az intermedier CYP3A4 expressziójú májgrafttal transzplantált betegeknél) a 0,1 mg/kg kezdő dózist megfelelőnek találtuk és csak az alacsony és magas CYP3A4 expressziójú, valamint a *CYP3A5\*1*-t hordozó májgraft átültetésekor volt szükség dózis-változtatásra (**D22**). A szívtranszplantált betegeknél azonban a kezdő dózis módosítását javasoltuk minden esetben (alacsony CYP3A4 expressziójú betegeknél 20%-os csökkentés, intermedier CYP3A4 expresszió esetén 40%-os dózis emelés, *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél 2,4-szeres emelés) (**D23**). A beültetésre kerülő májgraftok vagy a szívtranszplantált recipiensek CYP3A-státuszának jellemzése segítheti a terápiás hatáshoz szükséges céldózis megállapítását, mérsékelheti a vérszint ingadozásokat, azonban hangsúlyozni kell, hogy nem helyettesítheti a takrolimusz (vagy ciklosporin) vérszintek folyamatos ellenőrzését. A májgraft CYP3A-státuszához igazított takrolimusz terápia nemcsak a stabil terápiás vérszint beállításának idejét rövidítette le, de jelentősen csökkentette a hibás dozírozásból fakadó akut kilökődési epizódok számát és a vesetoxicitás kockázatát is (**D24**), ami a késői időszakban bekövetkező szövődmények kialakulását is csökkentheti.

A CYP2C9-státusz (a *CYP2C9* genotípus és a *CYP2C9* expresszió) alapján történő gyógyszer-metabolizáló képesség becslés jelentőségét igazoltuk epilepsziás gyermekek valproát terápiájának beállítása során. A polimorf *CYP2C9* allélok azonosítása csak részben adott információt a gyermekek valproát-lebontó képességéről; ugyanakkor kimutattuk, hogy a valproát vérszint kialakulásában a *CYP2C9* expressziójának is jelentős szerepe van (**D25**). Másrészt a gyermekeknél megfigyelt *CYP2C9*-státusz – valproát vérszint összefüggés felnőtteknél nem volt igazolható (**S4**), amely a *CYP2C9*-függő és *CYP2C9*-független valproát metabolizmus meghatározó szerepének gyermek- és felnőttkorban való eltolódását jelenti, és amely talán magyarázatul szolgálhat a valproát mellékhatások korfüggő megjelenésére is. A gyermekek *CYP2C9*-státuszának ismerete elősegítette az optimális, személyre szabott valproát terápia kialakítását, hozzájárult a valproát vérszint pontosabb beállításához és a valproáthoz köthető mellékhatások, mint a kóros alkalikus foszfátáz szint és az abnormálisan magas ammónia vérkoncentráció kockázatának csökkenéséhez (**D26**). Ugyan a valproát kezeléssel összefüggő súlyos mellékhatások általában ritkán fordulnak elő, gyermekeknél, különösen 2 éves kor alatt gyakoribbak, mint felnőtteknél (Guerrini 2006; Nanau 2013). A hiperammonemia gyakorisága pedig valproát terápia során gyakoribb, mint más antiepileptikummal történő kezelés során (Yamamoto 2013). Ezért gyermekeknél a valproát terápia megkezdése előtt elvégzett *CYP2C9*-státusz felmérés és a hozzá igazított dozírozás biztonságosabb valproát kezelést tesz lehetővé. A gyermekek valproát terápiájában a *CYP2C9* meghatározó szerepét és a *CYP2C9*-státusz alapján kialakított kezelés előnyeit számos szerző hangsúlyozta (Franco 2015; Mei 2017; Xu 2021; Fang

2021; Iannaccone 2021). Az *Epilepsia* folyóirat szerkesztői külön lehetőséget biztosítottak számunkra, hogy a klinikusok számára lényeges, a CYP2C9-státuszhoz igazított valproát terápiával kapcsolatos kérdéseket nyílt fórumon megvilágítsuk (S6).

A CYP enzimek genetikai variabilitása és a nem-genetikai faktorok által időszakosan kiváltott gyógyszer-metabolizáló képesség megváltozása különösen kritikus lehet a pszichiátriai betegek pszichofarmako-terápiája során, hiszen az alacsony gyógyszer vérszint a hatás elmaradásához vezet, azaz a beteg nem reagál a kezelésre, míg a magas vérkoncentráció fokozott mellékhatás kockázattal jár. Az antipszichotikumok érdemi hatásának eléréséhez általában hetekre van szükség; másrészt a szkizofrénia terápiais protokoll szerint a kezelésre nem reagáló betegeket is legalább két hétig szükséges kezelni az adott szerrel, mielőtt gyógyszerváltás történne (Leucht 2007). Ezért a hatóanyagok metabolizmusában döntő szerepet játszó enzimek, illetve a gyenge vagy fokozott gyógyszer-metabolizáló képesség előzetes ismerete nagyban hozzájárulhat a biztonságos és hatékony terápia kialakításához. A metabolizmust katalizáló, meghatározó enzim(ek) azonosításának jelentőségére hívtuk fel a figyelmet klozapin-kezelt betegeknél végzett vizsgálataink során. Az általános klinikai vélekedés szerint a CYP1A2 a domináns enzim a klozapin átalakításában, azonban kimutattuk, hogy alacsony CYP1A2 expresszió mellett a CYP3A4 és CYP3A5 aktivitása előtérbe kerülhetett, ami nagy variabilitást jelentett a klozapin vérszintjében és a metabolitok – az inaktív klozapin N-oxid és a farmakológiailag aktív norklozapin – koncentrációjában is (D28). Ezen eredmények alapján Wicinski és Weclawicz (2018), valamint John és Kecanovic (2021) olyan klinikai megfigyelésekre találtak magyarázatot, ahol a klozapin vérszintet vagy a betegek dóziséigényét a CYP3A4 enzim aktivitását befolyásoló hatóanyagok (pl. rifampicin, oxkarbazepin, citalopram, escitalopram) párhuzamos alkalmazása jelentősen módosította. A kényes gondossággal beállított terápia is felborulhat az akár átmenetileg fennálló farmakokinetikai gyógyszer-kölcsönhatások miatt. Ékes példája volt a párhuzamosan alkalmazott gyógyszeres kezelés (pl. kombinált antipszichotikum terápia, vagy az antipszichotikum okozta mellékhatás gyógyszeres kezelése stb.) által okozott vérszint eltolódásnak az aripiprazol „clearance” megváltozása risperidon, metoprolol vagy propranolol kezelés miatt (D27). A betegek *CYP2D6* genotípusa, amely számottevően befolyásolta az aripiprazol vérszintet és a dehidroaripiprazol képződés mértékét, alapvetően meghatározta a betegek aripiprazol dóziséigényét. Ugyanakkor a *CYP2D6* enzim aktivitását gátló szerek, a kombinált terápiában alkalmazott risperidon, illetve az aripiprazolhoz köthető mellékhatás, a kényszeres mozgás (akathisia) kezelésére szánt metoprolol vagy propranolol, módosították az aripiprazol vérszintjét *CYP2D6\*1* allélt hordozó betegeknél. A *CYP2D6*-gátló hatóanyagok

okozta fenokonverziót és aripiprazol vérszint emelkedést az aripiprazolról készült legfrissebb összefoglaló is ismertette (Dean 2021).

A hatékonyság és a mellékhatások elkerülése érdekében különösen javasolt egyes hatóanyagok vérszintjének ellenőrzése a kezelés beállítása során (Hiemke 2011), azonban nem minden pszichofarmakonra vonatkozik szigorúan az ajánlás, a metabolitok vérszint ellenőrzésére pedig általában nem kerül sor. A klonazepam dózis meghatározása is tünet-vezérelt módon történik az általános klinikai gyakorlatban annak ellenére, hogy a CYP3A4 szerepe a klonazepam-metabolizmusban régóta ismert, vizsgálatainkban pedig közvetlen bizonyítékkal szolgáltunk a klonazepam-metabolizáló képesség és a CYP3A4 expresszió szoros kapcsolatára (**D29**). Az életkorral csökken a CYP3A4 aktivitás (Tanaka 1998), így a klonazepam-metabolizáló képesség is, ezért különösen fontos lenne idős korú betegeknél a CYP3A4 expresszió vagy legalább a klonazepam vérszint ellenőrzése. Kimutattuk, hogy az alacsony CYP3A4 expressziójú betegek csökkentett klonazepam dózist igényelnek. A túldozírozásból fakadó emelkedett vérszint (>60 ng/ml) ugyanis növeli a mellékhatás kockázatot és a szédülés, járás-bizonytalanság, egyensúly-zavar okozta esések pedig súlyos következményekkel járnak az idősekre nézve (Pariente 2008). A 7-amino-klonazepam akkumulációja, amely intermediér/magas CYP3A4 expressziójú NAT2 lassú acetiláló fenotípusú betegeknél jelentkezett, szintén okozhat kellemetlenségeket például a terápia leállításakor. A 7-amino-klonazepam magas vérkoncentrációnál leszorítja a klonazepamot a benzodiazepin receptorról, ami hasonló megvonási tüneteket vált ki, mint a terápia hirtelen felfüggesztése. Ezért az intermediér/magas CYP3A4 expressziójú NAT2 lassú acetiláló fenotípusú betegeknél a klonazepam leállítását kis léptékű dózis-csökkentéssel (<0,25 mg/hét), hosszabb idő alatt tanácsos végrehajtani (Nardi 2010).

A bemutatott klinikai vizsgálatok eredményei azt példálták, hogy betegek gyógyszer-metabolizáló képessége alapján az egyes hatóanyagok várható vérszintjének és a betegek dózisigényének becslése komplex feladat, de a gyógyszerhatékonyság és gyógyszerbiztonság szempontjából mindenképpen hasznos a betegek számára. A CYP-státuszhoz igazított kezelési stratégia klinikai gyakorlatba való beépülése számos előnyt (pl. gyógyszerhatékonyság javulása, mellékhatások csökkenése, gyorsabb állapot stabilizálódás, a beültetett szerv és a beteg-túlélés javulása) jelenthet a jövőben.

## 5. ÖSSZEGZÉS ÉS KITEKINTÉS

A **biztonságos és hatékony gyógyszeres terápia kialakítása** egyaránt érdeke a klinikusnak és a betegnek, de a fejlesztőnek/gyártónak és a gyógyszer-engedélyező hatóságnak is. A gyógyszerek farmakokinetikai, metabolizmus és gyógyszer-interakciós sajátosságainak feltérképezése, a gyógyszer-metabolizmust befolyásoló genetikai és nem-genetikai természetű tényezők azonosítása, a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének megállapítása és az ismeretek alapján kialakítható személyre szabott terápia alkalmazása nagyban hozzájárul a biztonságos gyógyszerhasználathoz, a mai kor „primum nil nocere” alapkövetelményéhez. Az értekezés e területen végzett kutatómunkámat összegezte három egymásra épülő részben bemutatva.

1. A preklinikai vizsgálatok ma már elképzelhetetlenek ***in vitro* májmodellek** (primer hepatociták, máj mikroszóma modell) nélkül, amelyek a maguk korlátai ellenére értékes információt szolgáltatnak a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedéséről, a metabolizmus útvonalairól, a metabolizmust katalizáló enzimekről és a lehetséges farmakokinetikai gyógyszer-interakciókról. Nem elhanyagolható szempont, hogy az előzetesen elvégzett *in vitro* vizsgálatok eredményei drasztikusan csökkenthetik az *in vivo* biztonsági vizsgálatok laboratóriumi állat felhasználását is, mivel megkönnyítik a dózis-keresést és a biztonsági vizsgálatok eredményeinek értelmezését. A MTA Kémiai Kutatóközpont Farmakobiokémiai Osztályán Magyarországon elsőként honosítottuk meg, majd a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások kutatócsoportban továbbfejlesztettük az *in vitro* májmodell alapú, többszintű vizsgálati rendszert, amellyel számos fejlesztés alatt álló hatóanyagról nyertünk információt. Az értekezésben a koleszterinszint-csökkentő LK-935 és LK-980 (Lek Pharmaceuticals d.d.), az anxiolitikumként fejlesztett deramciklan és az ösztrogén receptor antagonistá panomifen (EGIS Gyógyszergyár ZRt), valamint az AMPA antagonistá GYKI-47261 (IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft) hatóanyagokkal végzett munkáinkat ismertettem. Bemutattam, hogy a primer hepatociták viszonylag egyszerű modellt jelentenek és jól alkalmazhatók az *in vitro* farmakokinetikai viselkedés tanulmányozására, a laboratóriumi állatok és az ember hepatocitái közti farmakokinetikai és metabolit-profil különbségek feltárására, valamint az *in vivo* várható farmakokinetikai paraméterek becslésére. Az *in vitro* - *in vivo* becslés megbízhatóságát forgalomban lévő pszichofarmakonok humán hepatocitákban mutatott farmakokinetikai viselkedése alapján prediktálható és a klinikai vizsgálatok során kapott biohasznosulási adatok jó egyezésével igazoltuk. A hepatocita vagy a máj mikroszóma inkubálás során a hatóanyagból képződő metabolitok a szerkezet-azonosításhoz elegendő mennyiségben és tisztaságban nyerhetők ki. A gyógyszerbiztonság megteremtésének szintén részét képezi a hatóanyagok farmakokinetikai gyógyszer-interakciós sajátosságainak feltárása (a metabolizmusban részt vevő enzimek azonosítása, CYP-gátló és indukáló képesség

meghatározása), amely rávilágíthat a klinikai alkalmazás során várható polimorf metabolizmusra és a multidrog terápia okozta farmakokinetikai eltérésekre. Bemutattuk azt is, hogy ezen *in vitro* módszerek nemcsak a gyógyszerfejlesztés során, de a már forgalomban lévő hatóanyagok mellékhatás mechanizmusának felderítésében is segítséget jelentenek. A paracetamol túladagolás miatt bekövetkező májkárosodás kivédésének lehetséges módját, - a toxikus NAPQI metabolit képződés visszaszorítását CYP2E1-gátló hatóanyagokkal - vázoltuk fel, amely alapján a 4-metilpirazolt több esetben is sikerrel alkalmazták paracetamol mérgezés kezelésében betegeknél. Feltártuk az állatgyógyászatban használt két antibiotikum, a tiamulin és a monensin együttes alkalmazása során fellépő toxicitás hátterét (a tiamulin gátolja a monensin metabolizmusát). A tiamulin CYP3A-gátló (és indukáló) sajátságára, mint potenciális gyógyszer-interakciók forrására az EFSA külön figyelmeztet a monensinről készült összefoglaló munkákban.

2. A **gyógyszer-metabolizmusban megfigyelhető jelentős egyéni eltérések**, amelyek a gyógyszerhatékonyságot és a mellékhatások megjelenését is nagyban befolyásolják, elsősorban a hatóanyagok metabolizmusát katalizáló enzimek genetikai polimorfizmusaira vezethetők vissza, míg az átmenetileg fellépő fenokonverzió éppen az időszakossága miatt a gyógyszeres terapiák „Achilles sarkát” jelenti. Ezért első lépésként az egyes allélvariánsok enzimaktivitást és/vagy expressziót befolyásoló hatását fontos meghatározni, amelynek eredményei a PharmVar adatbázisában folyamatosan gyűlnek. A *CYP1A2* SNP-k és allélvariánsok *CYP1A2* enzimaktivitásra és expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata során kapott új eredményekkel magunk is bővítettük a genotípus-fenotípus összefüggéseket (1. a *CYP1A2\*IV* allél aktivitást és expressziót növelő hatása volt valószínűsíthető; 2. a dohányzás minden olyan *CYP1A2* allélvariánsnál, amely hordozta a -163A SNP-t, fokozott *CYP1A2* expressziót váltott ki). Ugyanakkor a nem-genetikai tényezők (életkor, megbetegedések, gyógyszeres kezelések, dohányzás, táplálékkiegészítők fogyasztása stb.) okozta módosulások feltárása egyfajta kihívást jelent. A CYP-szelektív hatások tisztázása már a preklinikai gyógyszer-interakciós tulajdonságok felmérése során elkezdődik, míg a hatásmechanizmus felderítése a kölcsönhatások megértését és további kölcsönhatások felismerését is elősegíti (pl. 1. a dexametazon poszt-transzkripció mechanizmussal csökkentette a *CYP1A1* indukcióját humán májsejtekben, míg a *CYP1A2* indukciót nem módosította; 2. a dehidroepiandrosteron a *CYP1A2* indukciót szorította vissza, de a *CYP1A1* indukciót nem befolyásolta; 3. a dehidroepiandrosteron aktiválta a CAR-t és ezzel minden olyan *CYP* gén expresszióját és aktivitását is növelte, amely CAR szabályzás alatt áll). Nem teljesen kézenfekvő, de szintén számolni kell a nem CYP-szelektív hatásokkal is, mint a krónikus alkoholfogyasztás vagy az amoxicillin+klavulánsav kezelés, amelyek jelentősen csökkenthetik a *CYP* gének expresszióját. Tovább színesíti a képet, hogy amint azt kimutattuk a

genotípus-fenotípus eltérés („mismatch”) mértéke az egyes CYP enzimeknél igencsak különböző. A két véglet: a CYP2D6, amelynél a genotípus viszonylag jól tükrözi a CYP2D6 aktivitást és a CYP1A2, ahol sokkal inkább a CYP1A2 expresszió, mint a genetikai háttér határozza meg az enzimaktivitást.

3. Általánosan érvényes, minden egyes hatóanyag személyre szabott dozírozásának meghatározására alkalmas szabályszerűség felállítása meglehetősen nehéz vállalkozás, bár nem is feltétlenül ez a cél. Sokkal lényegesebb, hogy a szűk terápiás indexű hatóanyagokra vonatkozóan, a hosszan tartó gyógyszeres kezelésekhez, esetleg multidrog terápiához készüljön iránymutatás, ahol a személyre szabott gyógyszeres kezelés jelentősen javíthatja a gyógyszerek hatékonyságát és csökkentheti a mellékhatások kockázatát. Számos hatóanyaggal kapcsolatban a CPIC ajánlást fogalmazott meg a betegek farmakogenetikai sajátságaihoz (főként CYP enzimek genetikai polimorfizmusaihoz) igazított dozírozásra, amelynek gondolatmenetét egészítettük ki a leukocita CYP expresszió alapján történő aktuális CYP aktivitás becslésével (**CYPtest<sup>TM</sup>**). **A CYP-státusz (CYP allélvariánsok és a leukocita CYP expresszió) alapján becsült gyógyszer-metabolizáló képesség** visszatükröződött a transzplantált betegek kalcineurin inhibitor vérszintjében (májátültetésen átesett betegek ciklosporin vérszintje, máj- és szívtranszplantált betegek takrolimusz vérkoncentrációja), epilepsziával kezelt gyermekek valproát vérszintjében, pszichiátriai betegek aripiprazol, klozapin vagy klonazepam vérkoncentrációjában, amely lehetővé tette a terápiás vérszint kialakulásához szükséges optimális hatóanyag dózis megállapítását is. A CYP-státuszhoz igazított takrolimusz, illetve valproát terápia számos előnyt jelentett a betegek számára a klasszikus klinikai gyakorlathoz (vérszint-alapú takrolimusz adagolás, tünet-alapú valproát dozírozás) képest: a takrolimusz gyorsabb stabil terápiás vérszintjének beállítása, a beültetett szerv kilökődésének és a vesekárosodás kockázatának csökkenése; a valproát terápiás tartományát átlépő vérkoncentráció kialakulásának csökkenése, az abnormálisan magas alkalikus foszfatáz szintek, valamint a hiperammonemia kialakulásának csökkenése. Tetten érhattük továbbá a gyógyszer-metabolizmust módosító nem-genetikai természetű tényezőket is. Ékes példáját láttuk az életkor (gyermekkor) miatt bekövetkezett valproát-metabolizmus eltolódásának a CYP2C9 enzim irányába, a veseelégtelenség (megbetegedés) miatt jelentkező CYP expresszió visszaszorulásának, a CYP2D6 gátlás (risperidonnal, metoprolollal, propranolollal) miatt kialakult aripiprazol vérszint emelkedésnek a vad-típusú *CYP2D6\*1* allélt hordozó betegeknél, a metilprednizolon dózis-redukció okozta CYP3A4 indukció mérséklődés miatt bekövetkezett takrolimusz vérszint emelkedésnek, vagy a dohányzás miatt kialakult CYP1A2 expresszió emelkedésének a *CYP1A2* -163A SNP-t hordozó pszichiátriai betegeknél.

## monostory\_24\_22

Az értekezésben azokat a munkákat mutattam be, amelyek rávilágítanak, hogy a gyógyszerbiztonság megteremtése már a fejlesztés korai, preklinikai időszakában elkezdődik és végigkíséri a hatóanyagok életútját a forgalomba hozatal után is a betegágnál. A személyre szabott gyógyszeres terápia kialakítása komplex feladat, amelynek során figyelemmel kell lennünk a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésén és gyógyszer-interakciós sajátosságain túl a betegek gyógyszer-metabolizáló képességére is. Az észszerűen módosított dozírozás pedig csökkentheti a mellékhatás kockázatát és javíthatja a gyógyszerek hatékonyságát is.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Primer májmodellek (hepatocita és máj mikroszóma modell) alkalmazhatóságát igazoltuk gyógyszer-hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének becslésére, metabolit-profil és metabolizmus útvonalak (metabolit szerkezetek) meghatározására és farmakokinetikai gyógyszer-interakciók feltérképezésére. **(D1-5, D9)**

- A primer májsejt modellen nyert *in vitro* farmakokinetikai paraméterek ( $t_{1/2}$  felezési idő,  $Cl_{int}$  „intrinsic clearance”) alapján becsülhetők az *in vivo* paraméterek ( $Cl_H$  máj „clearance”,  $E$  máj extrakciós hatásfok,  $F$  biohasznosulás). A pszichofarmakon modell vegyületek esetén a humán hepatocitákból becsült és a klinikai vizsgálatokból ismert biohasznosulás jó egyezést mutatott, azaz jó a primer májsejt modell *in vivo* predikciós értéke. **(D1)**
- Májmodellek alkalmazásával feltártuk a koleszterinszint-csökkentő LK-935 és az ösztrogén receptor antagonistá panomifen metabolikus útvonalait. A LK-935 humán metabolizmusa során a központi nitrogén dealkilációja (propil, illetve hidroxietilpiridin oldallánc lehasadása), valamint a molekula hidroxilezése (propil-oldalláncon, piridin-gyűrűn) következett be. A panomifen metabolitok a hidroxietil-aminoetoxi oldallánc rövidülésével és 4-hidroxilezéssel jöttek létre. A humán-specifikus panomifen metabolit (oldalláncon kialakuló kettőskötés) képződése nem tekinthető előnyösnek, mert a laboratóriumi állatokon végzett toxikológiai vizsgálatokban nem nyerhető információ a hatásáról. **(D2, D4)**
- Enzim-térképezéssel azonosítottuk a LK-935 metabolizmusát katalizáló CYP3A4 és CYP2C9 enzimet, továbbá az anxiolitikum deramciklan átalakításában domináns szerepet játszó CYP2E1-et, amely a klinikai alkalmazás során várható farmakokinetikai különbségeket valószínűsíti **(D2, D5)**. Igazoltuk, hogy a CYP2E1 aktivitás jellemzésére használt *p*-nitrofenol hidroxilezését elsődlegesen a CYP2A6 és a CYP2C19 katalizálja, így nem tekinthető CYP2E1-szelektív szubsztrátnak **(D6)**. A CYP2C9-szelektív szubsztrátnak tartott 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarinról megállapítottuk, hogy *O*-demetilezését egyéb enzimek (CYP2E1, CYP2C19, CYP2B6) is végzik, ami megkérdőjelezi a CYP2C9-szelektivitását **(D7)**.
- Humán hepatocitákban a LK-935 fokozta a CYP3A4 expresszióját és aktivitását, amelynek háttérében a PXR-aktiválás áll, így hasonlóan egyéb koleszterinszint-csökkentőkhöz gyógyszer-interakciók forrása lehet. Ugyanakkor a LK-980 nem okozott CYP3A4 indukciót, ami előnyt jelenthet a LK-935-el szemben **(D2, D3)**. Az AMPA antagonistá GYKI-47261-ről kimutattuk, hogy stabilizálta a CYP2E1 enzimfehérjét, a CYP2E1 mRNS expressziót azonban nem befolyásolta; azaz képes a CYP2E1 látszólagos indukcióját kiváltani, ami a CYP2E1-szubsztrátok fokozott metabolizmusát okozhatja **(D9)**.



2. Magyarázatul szolgáltunk az állatgyógyászatban alkalmazott tiamulin+monensin kombináció során fellépő súlyos mellékhatások kialakulására. A tiamulin kettős hatást gyakorolt a patkány CYP3A enzimekre, indukálta a CYP3A expressziót és közvetlenül gátolta a CYP3A működést. A monensinnel való kölcsönhatásban és a toxikus tünetek kialakulásában azonban inkább a CYP3A gátlásnak van meghatározó szerepe (**D10**).
3. Kimutattuk, hogy a paracetamol mérgezéshez vezető reaktív *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin (NAPQI) képződés visszaszorítása CYP2E1 és CYP2A6 enzimaktivitást gátló hatóanyagokkal (pl. 4-metilpirazol, diszulfiram) lehetséges, azonban a klinikai gyakorlatban alkalmazott cimetidin erre a célra nem megfelelő, mivel nem csökkenti a NAPQI termelődést (**D8**).
4. A gyógyszer-metabolizmust befolyásoló *CYP* allélvariánsok alapján meghatározott genotípusból az egyes *CYP* enzimeknél eltérő mértékben következtethetünk a *CYP* enzimaktivitásra (0-67%). A *CYP* genotípus-fenotípus eltérésekért („mismatch”) a fenokonverziót kiváltó nem-genetikai tényezők lehetnek felelősek (15-34%). Kimutattuk, hogy a *CYP*-szelektív gátlás és indukciós hatások mellett számolni kell a nem *CYP*-specifikus hatásokkal, mint a krónikus alkoholfogyasztás és az amoxicillin+klavulánsav kezelés, amelyek szignifikánsan csökkentették számos *CYP* enzim expresszióját és aktivitását (**D11-16**).
5. Megállapítottuk, hogy a *CYP1A2* genotípus alapján kevésbé lehet következtetni a *CYP1A2* fenotípusra, bár a *CYP1A2\*IV* variáns *CYP1A2* aktivitást és expressziót növelő hatása valószínűsíthető volt. Ugyanakkor a dohányzás minden olyan *CYP1A2* allélvariánsnál, amely hordozta a -163A SNP-t (rs762551), fokozott *CYP1A2* expressziót váltott ki. Igazoltuk, hogy a gyakorinak tartott *CYP1A2\*IF* allél valójában ritkán fordul elő a kaukázusi fehér populációban ( $\leq 0,4\%$ ), amelyet azzal magyaráztunk, hogy a *CYP1A2\*IF*-re jellemző -163C>A SNP más SNP-ekkel kapcsoltan jelentkezik egyéb *CYP1A2* allélvariánsokban (pl. *CYP1A2\*IL*, *CYP1A2\*IM*, *CYP1A2\*IV*, *CYP1A2\*IW*). (**D11**)
6. A szintetikus szteroid dexametazon (glukokortikoid) és az endogén szteroid dehidroepiandroszteron (hormon prekursor) *CYP* expressziót módosító hatásában számos eltérést és hasonlóságot mutattunk ki:
  - Humán májsejtekben a dexametazon a *CYP1A2* indukciót nem befolyásolta, azonban a *CYP1A1* indukcióját mérsékelte, csökkentette a *CYP1A1* fehérje expressziót és aktivitást, míg a *CYP1A1* transzkripcióját nem módosította. A dehidroepiandroszteron a *CYP1A1* indukcióra nem volt hatással, viszont a *CYP1A2* indukcióját mérsékelte az androgén receptor aktiválásán keresztül a *CYP1A2* mRNS degradációjának fokozásával. (**D17, D18**)
  - A dexametazon *CYP1A1* indukciót módosító aktivitásában különbség volt megfigyelhető a patkány és az ember között. Patkány májsejtekben a dexametazon a *CYP1A1* induktor

3-metilkolantrén hatását potenciózta, addig humán májsejtekben épp ellenkezőleg, enzimfehérje szinten redukálta a CYP1A1 expressziót. (D17)

- A dehidroepiandroszteronról igazoltuk, hogy szemben a dexametazonnal, képes a CAR-t aktiválni, amely hozzájárult a CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek indukciójához. (D19)
7. A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére a klinikai gyakorlatban is alkalmazható diagnosztikai eljárást dolgoztunk ki (CYPtest<sup>TM</sup>), amellyel a CYP enzimek aktivitását befolyásoló genetikai polimorfizmusok, valamint az aktuális leukocita CYP expresszió mértéke alapján értékeljük a CYP metabolizáló fenotípust (D20, D21). A leukocitákban lévő mRNS expresszió jól tükrözte a máj CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimaktivitását, a leukocita CYP2B6 és CYP2D6 expressziót azonban nem találtuk alkalmasnak a máj CYP2B6 és CYP2D6 enzimaktivitásainak becslésére (D20). A máj CYP2D6 aktivitása viszonylag jó egyezéssel becsülhető a *CYP2D6* genotípus alapján (D16), a CYP1A2 aktivitást a leukociták CYP1A2 mRNS expressziójából állapítjuk meg (D11, D20), míg CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4/5 enzimaktivitásokra a *CYP* genotípus és a leukocita CYP mRNS expresszió együttes értékelésével következtethetünk (D20).
8. Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek nagy részénél (51-77%-ánál) a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 expresszió szignifikáns csökkenését mutattuk ki, amely közvetlen bizonyítékot szolgáltatott a vesebetegeknél megfigyelt, CYP enzimekhez köthető romló gyógyszer-metabolizmusra. (D21)
9. Májtranszplantált betegeknél szoros összefüggést mutattunk ki a beültetett donor máj CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 mRNS expresszió) és a recipienseknél mérhető normalizált (dózis/testtömeggel) ciklosporin, illetve takrolimusz vérszintek között a korai posztoperatív időszakban. A CYP3A-státusz alapján mind a ciklosporin, mind a takrolimusz terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózis módosítására tettünk javaslatot, intermedier CYP3A4 mRNS expressziójú (*CYP3A5*\*3/\*3 genotípusú) szerv átültetését követően a kalcineurin inhibitor dóziséigény megegyezett a klinikai protokoll által javasolt kezdő dózissal (takrolimusz: 0,1 mg/kg; ciklosporin: 10 mg/kg), azonban a dózis 50%-os csökkentésére volt szükség az alacsony CYP3A4 expressziójú (*CYP3A5*\*3/\*3 genotípusú) májgrafttal transzplantált betegeknél, míg a magas CYP3A4 expresszió vagy a *CYP3A5*\*1 allél a dózis emelését igényelte (ciklosporin kezdő dózisának 30-40%-os emelése, takrolimusz kezdő dózisának 2-szeresre emelése) (D22). A vérszint-alapú takrolimusz dozírozáshoz képest a májgraft CYP3A-státuszához igazított takrolimusz terápia lerövidítette a stabil terápiás vérszint beállításának idejét, valamint

csökkentette a hibás dozírozásból fakadó akut kilökődési epizódok számát és a vesetoxicitás kockázatát is (**D24**).

10. Szívátültetésen átesett betegek CYP3A-státuszának függvényében szignifikáns takrolimusz vérszint és dózisirány különbségeket állapítottunk meg, hasonlóan a májtranszplantált betegekhez. A kezdő takrolimusz dózis (0,1 mg/kg) módosítását javasoltuk minden esetben (alacsony CYP3A4 expressziójú betegeknél 20%-os csökkentés, intermedier CYP3A4 expresszió esetén 40%-os dózis emelés, *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél 2,4-szeres emelés). Kimutattuk, hogy a transzplantációt követően alkalmazott magas metilprednizolon dózis a CYP3A4-indukáló képesség miatt jelentősen javította az alacsony posztoperatív CYP3A4 expressziót már az első hónap végére, míg a metilprednizolon dózis redukciójával párhuzamosan fokozatosan nőtt a dózis/testtömeggel normalizált takrolimusz vérszint a *CYP3A5\*3/\*3* genotípusú betegeknél. A metilprednizolon dózis változtatások azonban nem okoztak szignifikáns takrolimusz vérszint változást a *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél, ami a *CYP3A4* és *CYP3A5* eltérő indukálhatóságára utal. (**D23**)
11. A valproát gyermekeknél domináns CYP2C9 metabolizmusát és a CYP2C9-státusz (*CYP2C9* genotípus és CYP2C9 expresszió) alapján történő valproát-metabolizáló képesség becslés alkalmazhatóságát igazoltuk epilepsziás gyermekeknél. A CYP2C9-státusz és a valproát vérszint között kimutatott összefüggés alkalmas volt a fenntartó dózis megállapítására (két polimorf *CYP2C9* allélt hordozóknak alternatív terápia; heterozigóta *CYP2C9* genotípusúaknak 50%-kal csökkentett, 10-20 mg/kg dózis; *CYP2C9* vad genotípusú alacsony CYP2C9 expressziójú betegeknél csökkentett, 10-20 mg/kg dózis, intermedier CYP2C9 expressziójúaknak normál 30-40 mg/kg dózis, magas expressziójúaknak >40 mg/kg dózis javasolt). A CYP2C9-státuszhoz igazított valproát terápia hozzájárult a valproát vérszint pontosabb beállításához és a valproát kezeléshez köthető mellékhatások, mint a kóros alkalikus foszfátáz szint és az abnormálisan magas ammónia vérkoncentráció kockázatának csökkenéséhez. (**D25, D26**)
12. A pszichiátriai betegeknél alkalmazott aripiprazol antipszichotikum vérszintjének kialakulásában és a fő metabolit dehidroaripiprazol képződésében domináns CYP2D6 enzim működését a párhuzamosan használt risperidon antipszichotikum, illetve a mellékhatás (akathisia) mérséklésére alkalmazott metoprolol és propranolol gátolta és aripiprazol vérszint emelkedést idézett elő azoknál, akik legalább egy vad-típusú *CYP2D6\*1* allélt hordoztak. A risperidon és 9-hidroxi metabolitja gátolta mind a dehidroaripiprazol, mind a hidroxi-aripiprazol képződését, azaz a risperidon metabolizmusával nem szűnt meg a CYP2D6-gátló hatás. A metoprolol és a propranolol csak a farmakológiailag aktív dehidroaripiprazol képződését blokkolta és így az aripiprazol metabolizmusát az inaktiválódást eredményező útvonalak felé terelte. (**D27**)

13. Az antipszichotikum klozapin vérszint kialakulásában az alacsony CYP1A2 expresszió mellett a CYP3A4 aktivitás előtérbe kerülhetett. Kimutattuk továbbá a CYP3A5 jelentőségét is; a vad-típusú *CYP3A5\*1* allélt hordozó betegeknél alacsony normalizált klozapin vérszintek jelentkeztek függetlenül a CYP3A4 expresszió mértékétől. **(D28)**
14. A hangulat-stabilizálóként alkalmazott (GABAerg gátlás fokozó) klonazepam terápia során a 7-amino-klonazepam metabolit felhalmozódását mutattuk ki CYP3A4 intermedier expressziójú és NAT2 lassú acetiláló fenotípusú betegeknél. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy a 7-amino-klonazepam a lassú acetiláció miatt nem képes tovább alakulni, ami a klonazepam hatását gyengítheti, vagy a terápia leállításakor megvonási tünetekhez vezethet. **(D29)**

## 7. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

\* levelező szerző

- D1 Tóth K, Sirok D, Kiss Á, Mayer A, Pátfalusi M, Hirka G, **Monostory K\***: Utility of *in vitro* pharmacokinetic data in prediction of *in vivo* hepatic clearance of psychopharmacons. *Microchemical Journal* 136: 193-199, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2016.10.028  
IF: 3,206
- D2 **Monostory K\***, Pascussi J-M, Szabó P, Temesvári M, Kőhalmy K, Acimovic J, Kocjan D, Kuzman D, Wilzewski B, Bernhardt R, Kóbori L, Rozman D: Drug-interaction potential of 2-((3,4-(dichlorophenethyl(propyl)amino)-1-(pyridin-3-yl)ethanol (LK-935), the novel non-statin type cholesterol lowering agent. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 375-385, 2009. doi: 10.1124/dmd.108.023887  
IF: 3,743
- D3 Ačimovič J, Korošec T, Seliškar M, Bjorkhem I, **Monostory K**, Szabó P, Pascussi J-M, Belic A, Urleb U, Kocjan D, Rozman D: Inhibition of sterol delta 7-reductase (DHCR7) and other post-lanosterol enzymes by LK-980, a novel inhibitor of cholesterol synthesis. *Drug Metabolism and Disposition* 39: 39-46, 2011. doi:10.1124/dmd.110.035840  
IF: 3,733
- D4 **Monostory K\***, Jemnitz K, Vereczkey L, Czira G: Species differences in metabolism of panomifene, an analogue to tamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition* 25: 1370-1378, 1997. PMID: 9394026  
IF: 2,356
- D5 **Monostory K\***, Kőhalmy K, Hazai E, Vereczkey L, Kóbori L: Role of CYP2E1 in deramciclane metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 1717-1722, 2005. doi: 10.1124/dmd.105.003772  
IF: 4,015
- D6 **Monostory K\***, Hazai E, Vereczkey L: Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in *p*-nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* 147: 331-340, 2004. doi: 10.1016/j.cbi.2004.03.003  
IF: 2,789
- D7 Porrogi P, Kóbori L, Kőhalmy K, Gulyás J, Vereczkey L, **Monostory K\***: Limited applicability of 7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin as CYP-selective substrate. *Pharmacological Reports* 60: 972-979, 2008. PMID: 19211991  
IF: 2,167
- D8 Hazai E, Vereczkey L, **Monostory K\***: Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291: 1089-1094, 2002. doi: 10.1006/bbrc.2002.6541  
IF: 2,935
- D9 Tamási V, Hazai E, Porsmyr-Palmertz M, Ingelman-Sundberg M, Vereczkey L, **Monostory K\***: GYKI-47261, a new AMPA antagonist is a CYP2E1 inducer. *Drug Metabolism and Disposition* 31: 1310-1314, 2003. doi: 10.1124/dmd.31.11.1310  
IF: 3,652
- D10 Szűcs G, Tamási V, Laczay P, **Monostory K\***: Biochemical background of toxic interaction between tiamulin and monensin. *Chemico-Biological Interactions* 147: 151-161, 2004. doi: 10.1016/j.cbi.2003.12.003  
IF: 2,789
- D11 Fekete F, Mangó K, Minus A, Tóth K, **Monostory K\***: CYP1A2 mRNA expression rather than genetic variants indicate hepatic CYP1A2 activity. *Pharmaceutics* 14(3): 532, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14030532  
IF: 6,525

- D12 Mangó K, Kiss ÁF, Fekete F, Erdős R, **Monostory K\***: *CYP2B6* allelic variants and non-genetic factors influence *CYP2B6* enzyme function. *Scientific Reports* 12: 2984, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-07022-9 IF: 4,996
- D13 Fekete F, Mangó K, Déri M, Incze E, Minus A, **Monostory K\***: Impact of genetic and non-genetic factors on hepatic *CYP2C9* expression and activity in Hungarian subjects. *Scientific Reports* 11: 17081, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-96590-3 IF: 4,996
- D14 Kiss Á, Vaskó D, Déri M, Tóth K, **Monostory K\***: Combination of *CYP2C19* genotype with non-genetic factors evoking phenoconversion improves phenotype prediction. *Pharmacological Reports* 70: 525-532, 2018. doi: 10.1016/j.pharep.2017.12.001 IF: 2,761
- D15 Temesvári M, Paulik J, Kóbori L, **Monostory K\***: High-resolution melting curve analysis to establish *CYP2C19*\*2 single nucleotide polymorphism: comparison with hydrolysis SNP analysis. *Molecular and Cellular Probes* 25: 130-133, 2011. doi: 10.1016/j.mcp.2011.01.003 IF: 2,078
- D16 Kiss Á, Tóth K, Juhász C, Temesvári M, Paulik J, Hirka G, **Monostory K\***: Is *CYP2D6* phenotype predictable from *CYP2D6* genotype? *Microchemical Journal* 136: 209-214, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2016.10.018 IF: 3,206
- D17 **Monostory K\***, Kóhalmy K, Prough, RA, Kóbori L, Vereczkey L: The effect of synthetic glucocorticoid, dexamethasone on *CYP1A1* inducibility in adult rat and human hepatocytes. *FEBS Letters* 579: 229-235, 2005. doi: 10.1016/j.febslet.2004.11.080 IF: 3,415
- D18 Belic A, Tóth K, Vrzal R, Temesvári M, Porrogi P, Orbán E, Rozman D, Dvorak Z, **Monostory K\***: Dehydroepiandrosterone post-transcriptionally modifies *CYP1A2* induction involving androgen receptor. *Chemico-Biological Interactions* 203: 597-603, 2013. doi: 10.1016/j.cbi.2013.04.002 IF: 2,982
- D19 Kóhalmy K, Tamási V, Kóbori L, Sárváry E, Pascussi J-M, Porrogi P, Rozman D, Prough RA, Meyer UA, **Monostory K\***: Dehydroepiandrosterone induces human *CYP2B6* through the constitutive androstane receptor. *Drug Metabolism and Disposition* 35: 1495-1501, 2007. doi: 10.1124/dmd.107.016303 IF: 3,907
- D20 Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, **Monostory K\***: Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341: 294-305, 2012. doi: 10.1124/jpet.111.189597 IF: 3,891
- D21 Déri M, Kiss Á, Tóth K, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L, **Monostory K\***: End-stage renal disease reduces the expression of drug-metabolizing cytochrome P450s. *Pharmacological Reports* 72(6): 1695-1705, 2020. doi: 10.1007/s43440-020-00127-w IF: 3,024
- D22 **Monostory K\***, Tóth K, Kiss Á, Háfra E, Csikány N, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L: Personalizing calcineurin inhibitor therapy by adjusting to donor *CYP3A*-status in liver transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 80: 1429-1437, 2015. doi: 10.1111/bcp.12747 IF: 3,830
- D23 Déri M, Szakál-Tóth Zs, Fekete F, Mangó K, Incze E, Minus A, Merkely B, Sax B, **Monostory K\***: *CYP3A*-status is associated with blood concentration and dose-requirement

- of tacrolimus in heart transplant recipients. *Scientific Reports* 11: 21389, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-00942-y IF: 4,996
- D24 Csikány N, Kiss Á, Déri M, Fekete F, Minus A, Tóth K, Temesvári M, Sárváry E, Bihari L, Gerlei Zs, Kóbori L, **Monostory K\***: Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant recipients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 87(4): 1790-1800, 2021. doi: 10.1111/bcp.14566 IF: 3,716
- D25 Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, Szever Z, **Monostory K\***: Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Personalized Medicine* 12: 199-207, 2015. doi: 10.2217/PME.14.82 IF: 1,000
- D26 Búdi T, Tóth K, Nagy A, Szever Z, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Garami M, Tapodi A, **Monostory K\***: Clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia*, 56: 849-855, 2015. doi: 10.1111/epi.13011 IF: 4,706
- D27 Kiss Á, Menus Á, Tóth K, Déri M, Sirok D, Gabri E, Belic A, Csukly G, Bitter I, **Monostory K\***: Phenoconversion of CYP2D6 by inhibitors modifies aripiprazole exposure. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 270(1): 71-82, 2020. doi: 10.1007/s00406-018-0975-2 IF: 5,276
- D28 Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, **Monostory K\***: Potential role of patients' CYP3A-status in clozapine pharmacokinetics. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 20(7): 529-537 (pyx019), 2017. doi: 10.1093/ijnp/pyx019 IF: 3,981
- D29 Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, **Monostory K\***: Optimization of clonazepam therapy adjusted to patient's CYP3A-status and NAT2 genotype. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19(12): pyw083, 2016. doi: 10.1093/ijnp/pyw083 IF: 4,712

## 8. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN KAPCSOLÓDÓ EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- S1 Szakál-Tóth Z, Soltész Á, Berzsenyi V, Csikos G, Varga T, Rácz K, Király Á, Szlávik J, Hartyánszky I, Prohászka Z, **Monostory K**, Merkely B, Németh E: Acute heart transplantation from mechanical circulatory support in a Human Immunodeficiency Virus positive patient with fulminant myocarditis. *ESC Heart Failure* 8: 1643-1648, 2021. doi: 10.1002/ehf2.13271 IF: 3,612
- S2 Gyimesi M, Rauscher A, Suthar SK, Hamow KÁ, Oravec K, Lőrincz I, Borhegyi Zs, Déri M, Kiss Á, **Monostory K**, Szabó P, Nag S, Tomasic I, Krans J, Tierney P, Kovács M, Kornya L, Málnási-Csizmadia A: Improved inhibitory and ADMET properties of blebbistatin derivatives indicate that blebbistatin scaffold is ideal for drug development targeting myosin-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 376(3): 358-373, 2021. doi: 10.1124/jpet.120.000167 IF: 4,402
- S3 Menus Á, Kiss Á, Tóth K, Sirok D, Déri M, Fekete F, Csukly G, **Monostory K\***: CYP3A4 expression may predict metabolic side-effects of clozapine in schizophrenia. *Scientific Reports* 10: 21283, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-78474-0 IF: 4,380

- S4 **Monostory K\***, Nagy A, Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Déri M, Csukly G: Relevance of CYP2C9 function in valproate therapy. *Current Neuropharmacology* 17(1): 99-106, 2019. doi: 10.2174/1570159X15666171109143654 IF: 4,668
- S5 **Monostory K\***: Metabolic drug-interactions with immunosuppressants. *Organ Donation and Transplantation – Current Status and Future Challenges*. (Tsoulfas G szerk.) ISBN 978-1-78923-341-4 InTechOpen, London, 2018, pp. 409-440. doi: 10.5772/intechopen.74524
- S6 **Monostory K\***, Búdi T, Tóth K, Nagy A, Szever Z, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Tapodi A, Garami M: In response: Commentary on clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia* 57: 1339-1340, 2016. doi: 10.1111/epi.13451
- S7 Nagy A, Búdi T, Temesvári M, Szever Z, Szabó PT, **Monostory K\***: Adverse events in a newborn on valproate therapy due to loss-of-function mutations in CYP2C9. *Epilepsy & Behavior Case Reports* 4: 86-87, 2015 doi: 10.1016/j.ebcr.2015.08.006
- S8 Belic A, Rozman D, Temesvári M, Tóth K, **Monostory K**, Vrzal R, Dvorak Z: Modelling of DHEA effect on CYP1A2 expression in LNCaP and MCF-7 cell lines. Proceedings – 8<sup>th</sup> EUROSIM Congress on Modelling and Simulation, EUROSIM 2013, art No 7004913, pp 30-35, 2015. doi: 10.1109/EUROSIM.2013.114
- S9 Kóbori L, Görög D, Fehérvári I, Nemes B, Fazakas J, Sárváry E, Varga M, Gerlei Z, Doros A, **Monostory K**, Perner F: Progress of the liver transplantation programme in Hungary (A hazai májátültetési program fejlődése) *Orvosi Hetilap* 154: 858-862, 2013. doi: 10.1556/OH.2013.29636
- S10 **Monostory K\***, Dvorak Z: Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Current Drug Metabolism* 12(2): 154-172, 2011. doi: 10.2174/138920011795016854 IF: 5,113
- S11 Rozman D, **Monostory K**: Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacology and Therapeutics* 127: 19-40, 2010. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.03.007 IF: 8,694
- S12 Belic A, Temesvári M, Kóhalmy K, Vrzal R, Dvorak Z, Rozman D, **Monostory K\***: Investigation of the CYP2C9 induction profile in human hepatocytes by combining experimental and modelling approaches. *Current Drug Metabolism* 10: 457-461, 2009. doi: 10.2174/138920009790820147 IF: 3,989
- S13 **Monostory K\***, Pascussi J-M, Kóbori L, Dvorak Z: Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metabolism Reviews* 41: 547-572, 2009. doi: 10.3109/03602530903112284 IF: 5,439
- S14 Vrzal R, Stejskalova L, **Monostory K**, Maurel P, Bachleda P, Pavek P, Dvorak Z: Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 147: 331-340, 2009. doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.035 IF: 2,475
- S15 **Monostory K\***, Pascussi J-M: Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chimica Slovenica* 55: 20-37, 2008 IF: 0,909
- S16 Kóbori L, Kóhalmy K, Porrogi P, Sárváry E, Gerlei Zs, Fazakas J, Nagy P, Járay J, **Monostory K\***: Drug-induced liver graft toxicity caused by cytochrome P450 poor



- metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology* 65: 428-436, 2008.  
doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03056.x IF: 3,128
- S17 Tamási V, **Monostory K\***: Citokróm P450 gének és azok variabilitása. A CYP1-4 enzimcsalád. in: Fejezetek a genomléptékű biológiából és orvostudományból (szerk. Falus A) Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006, p. 42-58.
- S18 Vereczkey L, Jemnitz K, **Monostory K**, Veres Z, Kóbori L: A gyógyszer-metabolizáló enzimrendszerek szerepe a gyógyszerek hatásában, illetve mellékhatásában. *Orvosi Hetilap* 146: 947-952, 2005. PMID: 15969306
- S19 Szűcs G, Laczay P, **Monostory K**, Móra Zs, Bajnógel J, Albert M: A monenzin és a tiamulin közötti toxikus kölcsönhatás vizsgálata patkányban. *Magyar Állatorvosok Lapja* 127: 122-125, 2005. IF: 0,114
- S20 **Monostory K\***, Kóhalmy K, Ludányi K, Czira G, Holly S, Ürmös I, Klebovich I, Vereczkey L, Kóbori L: Biotransformation of deramciclone in primary hepatocytes of rat, mouse, rabbit, dog and human. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 1708-1716, 2005.  
doi: 10.1124/dmd.105.003764 IF: 4,015
- S21 **Monostory K**, Tamási V, Vereczkey L, Perjési P: A study on CYP1A inhibitory action of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-cyclic chalcone analogues. *Toxicology* 184: 203-210, 2003.  
doi: 10.1016/S0300-483X(2)00578-4 IF: 2,061
- S22 Tamási V, Riedl Z, Dobozy O, Falus A, Vereczkey L, **Monostory K\***: *In vitro* induction of cytochrome P450 enzymes in hepatocytes isolated from the regenerating rat liver. *Polish Journal of Pharmacology* 56:113-119, 2004. PMID: 15047985 IF: 0,947
- S23 Tamási V, Vereczkey L, Falus A, **Monostory K\***: Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflammation Research* 52:322-333, 2003.  
doi: 10.1007/S00011-003-1186-4 IF: 1,498
- S24 Hazai E, Simon-Trompler E, Czira G, Vereczkey L, **Monostory K\***: A new HPLC method with radioactivity detection for the analysis of the toxic metabolite of acetaminophen. *Chromatographia* 56: S75-78, 2002. doi: 10.1007/bf02494117 IF: 1,230
- S25 Hazai E, **Monostory K**, Bakos Á, Zacher G, Vereczkey L: About hepatotoxicity of paracetamol overdose. *Orvosi Hetilap* 142: 345-349, 2001
- S25 Tamási V, Kiss Á, Dobozy O, Falus A, Vereczkey L, **Monostory K\***: The effect of dexamethasone on P450 activities in regenerating liver. *Biochemical Biophysical Research Communications* 286: 239-242, 2001. doi: 10.1006/bbrc.2001.5341 IF: 2,946

## 9. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- S26 Visca A, Barra Caracciolo A, Grenni P, Rolando L, Mariani L, Rauseo J, Spataro F, **Monostory K**, Sperlagh B, Patrolecco L: Legacy and emerging pollutants of an urban river stretch and effects on the microbial community. *Water* 13(23): 3402, 2021.  
doi: 10.3390/w13233402 IF: 3,530

- S27 Salgado D, Armean I, Baudis M, Beltran S, Capella-Gutierrez S, Carvalho-Silva D, Dominguez Del Angel V, Dopazo J, Furlong LI, Gao B, Garcia L, Gerloff D, Gut I, Gyenesi A, Habermann N, Hancock JM, Hanauer M, Hovig E, Johansson LF, Keane T, Korbel J, Lauer KB, Laurie S, Leskošek B, Lloyd D, Marques-Bonet T, Mei H, **Monostory K**, Piñero J, Poterlowicz K, Rath A, Samarakoon P, Sanz F, Saunders G, Sie D, Swertz MA, Tsukanov K, Valencia A, Vidak M, González CY, Ylstra B, Bérout C: The ELIXIR Human Copy Number Variations Community: building bioinformatics infrastructure for research. *F1000Research* 9(ELIXIR): 1229, 2020. doi: 10.12688/f1000research.24887.1
- S28 Fodor-Kardos A, Kiss Á, **Monostory K**, Feczko T: Sustained *in vitro* interferon-beta release and *in vivo* toxicity of PLGA and PEG-PLGA nanocomposites. *RSC Advances* 10: 15893-15900, 2020. doi: 10.1039/c9ra09928j IF: 3,361
- S29 Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Grenni P, Di Lenola M, Ademollo N, Rauseo J, Rolando L, Spataro F, Plutzer J, **Monostory K**, Sperlagh B: Chemical mixtures and autochthonous microbial community in an urbanized stretch of the River Danube. *Microchemical Journal* 147: 985-994, 2019. doi: 10.1016/j.microc.2019.04.021 IF: 3,594
- S30 Kovács T, Déri M, Fülöp A, Pálházy T, Háfra E, Sirok D, Kiss Á, Lotz G, Szijártó A, **Monostory K\***: Isoform-dependent changes in cytochrome P450-mediated drug metabolism after portal vein ligation in rat. *European Surgical Research* 59: 301-319, 2018. doi: 10.1159/000493923 IF: 1,629
- S31 Szilágyi B, Kovács P, Ferenczy G, Rácz A, Németh K, Visy J, Szabó P, Ilas J, Balogh GT, **Monostory K**, Vincze I, Tábi T, Szökő E, Keserű GM: Discovery of isatin and 1H-indazol-3-ol derivatives as D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26: 1579-1587, 2018. doi: 10.1016/j.bmc.2018.02.004 IF: 2,802
- S32 Sebestyén I, **Monostory K**, Hirka G: Environmental risk assessment of human and veterinary medicinal products - Challenges and ways of improvement. *Microchemical Journal* 136: 67-70, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2017.08.012 IF: 3,206
- S33 Sirok D, Pátfalusi M, Szeleczy G, Somorjai Gy, Greskovits D, **Monostory K\***: Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma. *Microchemical Journal* 136: 200-208, 2018. doi: 10.1016/j.microc.2016.11.005 IF: 3,206
- S34 Kiss R, Bajusz D, Baskin R, Tóth K, **Monostory K**, Sayeski P, Keserű GyM: Identification of 8-hydroxyquinoline derivatives active against somatic V658F mutant JAK1 dependent cells. *Archiv der Pharmazie* 349: 925-933, 2016. doi: 10.1002/ardp.201600246 IF: 1,994
- S35 Makia NL, Surapureddi S, **Monostory K**, Prough RA, Goldstein JA: Regulation of human CYP2C9 expression by electrophilic stress involves AP-1 activation and DNA looping. *Molecular Pharmacology* 86: 125-137, 2014. doi: 10.1124/MOL.114.092585 IF: 4,128
- S36 Belic A, Pompon D, **Monostory K**, Kelly D, Kelly S, Rozman D: An algorithm for rapid computational construction of metabolic networks: a cholesterol biosynthesis example. *Computers in Biology and Medicine* 43: 471-480, 2013. doi: 10.1016/j.compbiomed.2013.02.017 IF: 1,475

- S37 Pomozi V, Le Saux O, Brampton CN, Apana A, Iliás A, Szeri F, Martin L, **Monostory K**, Paku S, Sarkadi B, Szakács G, Váradi A: ABCC6 is a basolateral plasma membrane protein. *Circulation Research* 112: e148-e152, 2013. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300194  
IF: 11,089
- S38 Ekström L, Johansson M, **Monostory K**, Rundlöf A-K, Arnér ESJ, Björkhem-Bergman L: Simvastatin inhibits the core promoter of the *TXNRD1* gene and lowers cellular TrxR activity in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430: 90-94, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.007  
IF: 2,281
- S39 Sárváry E, Nemes B, Varga M, Gaál I, **Monostory K**, Langer RM, Görög D, Fazakas J, Kóbori L, Fehérvári I, Gerlei Z: Significance of mycophenolate monitoring in liver transplant recipients: toward the cut-off level. *Transplantation Proceedings* 44: 2157-2161, 2012. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.07.124  
IF: 0,952
- S40 Wörner M, Melchior K, **Monostory K**, Pascussi J-M, Huber CG, Bernhardt R: The effects of rosuvastatin and the CYP51A1 inhibitor LEK-935 on the proteome of primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 40: 414-418, 2012. doi: 10.1124/dmd.111.040402  
IF: 3,361
- S41 Hafner M, Juvan P, Rezen T, **Monostory K**, Pascussi J-M, Rozman D: The human primary hepatocyte transcriptome reveals novel insights into atorvastatin and rosuvastatin action. *Pharmacogenetics and Genomics* 21: 741-750, 2011. doi: 10.1097/FPC.0B013E32834A5585  
IF: 3,485
- S42 Tamási V, **Monostory K**, Prough RA, Falus A: Role of xenobiotic metabolism in cancer: involvement of transcriptional and miRNA regulation of P450s. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 1131-1146, 2011. doi: 10.1007/s00018-010-0600-7  
IF: 6,570
- S43 Rezen T, Rozman D, Pascussi J-M, **Monostory K\***: Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta – Proteins and Proteomics* 1814: 146-160, 2011. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.05.014  
IF: 3,635
- S44 Ozsvár Z, Solymossi Z, **Monostory K**: Acute reactive hepatitis in pregnancy. *Orvosi Hetilap* 151: 457-461, 2010. doi: 10.1556/OH.2010.28736
- S45 Sárváry E, Seregély Z, Fazakas J, Kovács F, Gaal I, Beko G, Varga J, Kóbori L, Nemes B, Görög D, Varga M, Langer RM, **Monostory K**, Járay J, Gerlei Z: Small difference in international normalized ratio may yield a significant impact on prioritizing patients listed for liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 42: 2317-2322, 2010. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.05.011  
IF: 0,993
- S46 Acimovic J, Lövgren-Sandblom A, **Monostory K**, Rozman D, Golicnik M, Lutjohann, Björkhem I: Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *Journal of Chromatography B* 877: 2081-2086, 2009. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.05.050  
IF: 2,777
- S47 Wörner M, Melchior K, Delmotte N, Hwang KH, **Monostory K**, Huber C, Bernhardt R: Shotgun proteomic analysis of the microsomal fraction of eukaryotic cells using a two dimensional reversed-phase x ion-pair reversed-phase HPLC setup. *Journal of Separation Science* 32: 1165-1174, 2009. doi: 10.1002/jssc.200800619  
IF: 2,551

- S48 Kóbori L, Németh T, Nagy P, Dallos G, Sótonyi P, Fehérvári I, Nemes B, Görög D, Patonai A, **Monostory K**, Doros A, Sárváry E, Fazakas J, Gerlei Zs, Benkő T, Piros L, Járay J, de Jong KP: Experimental results and clinical impact of using autologous rectus fascia sheath for vascular replacement. *Acta Veterinaria Hungarica* 56: 411-420, 2008. doi: 10.1556/avet.56.2008.3.14 IF: 0,624
- S49 Juvan P, Rezen T, Rozman D, **Monostory K**, Pascussi J-M, Belic A: Towards identification of gene regulatory networks of human cholesterol biosynthesis. *Acta Chimica Slovenica* 55: 396-407, 2008. IF: 0,909
- S50 Kóhalmy K, Rozman D, Pascussi J-M, Sárváry E, **Monostory K\***: Crosstalk between cholesterol homeostasis and drug metabolism. (A koleszterin homeosztázis és a gyógyszer-metabolizmus kapcsolata) *Orvosi Hetilap* 149: 1283-1289, 2008. doi: 10.1556/OH.2008.28329
- S51 Jemnitz K, Veres Z, **Monostory K**, Kóbori L, Vereczkey L: Interspecies differences in acetaminophen sensitivity of human, rat and mouse primary hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 22: 961-967, 2008. doi: 10.1016/j.tiv.2008.02.001 IF: 2,473
- S52 Vereczkey L, Jemnitz K, **Monostory K**, Veres Zs: Human cytochrome P450 and conjugating enzymes: their implication in drug metabolism in toxicology and in clinical practice. In *Monoamine Oxidase Inhibitors and their Role in Neurotransmission (Drug Development)* (eds. Török TL, Klebovich I) Medicina Publishing House Co., Budapest, 2004, pp. 217-230.
- S53 Bencsáth M, Tamási V, **Monostory K**: Dyslipidaemia és statinok avagy a lipidanyagcsere immun-bája. *Gyógyszerészet* 48: 24-31, 2004.
- S54 Tamási V, Fülöp AK, Hegyi K, **Monostory K**, Falus A: Upregulation of CYP2E1 and CYP3A activities in histamine-deficient histidine decarboxylase gene targeted mice. *Cell Biology International* 27: 1011-1015, 2003. doi: 10.1016/j.cellbi.2003.09.006 IF: 1,092
- S55 Vereczkey L, **Monostory K**, Jemnitz K, Veres Zs: The effect of the coadministration of different inducers on the expression of CYP and conjugating enzymes. *Nova Acta Leopoldina* 87: 333-337, 2003.
- S56 Jemnitz K, Lévai F, **Monostory K**, Szatmári I, Vereczkey L: The in vitro biosynthesis and stability measurement with acyl-glucuronide isoforms of the main metabolite of ipriflavone. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 25: 153-160, 2000. doi: 10.1007/bf03192307 IF: 0,488
- S57 Jemnitz K, Veress Zs, **Monostory K**, Vereczkey L: Glucuronidation of thyroxine in primary monolayer cultures of rat hepatocytes: In vitro induction of UDP-glucuronosyltransferases by methylcholanthrene, clofibrate, and dexamethasone alone and in combination. *Drug Metabolism and Disposition* 28: 34-37, 2000. IF: 2,513

## 10. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PhD DISSZERTÁCIÓK

- Csikány Nóra: A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított személyre szabott immunszuppresszív kezelés májtranszplantáción átesett betegeknél. PhD 2022
- Déri Máté Tamás: A CYP enzim fenokonverzió jelentősége a transzplantációs immunszuppresszióban, valamint krónikus vesebetegségben. PhD 2022
- Kiss Ádám Ferenc: Genotípus alapján történő CYP2C19 és CYP2D6 fenotípus becslés és klinikai alkalmazhatósága PhD 2020
- Tóth Katalin: A gyógyszer-metabolizáló képességhez igazított pszichofarmakoterápia lehetőségei. PhD 2018
- Büdi Tamás: Molekuláris diagnosztikai módszerek klinikai jelentősége gyermekek egyénre szabott gyógyszeres kezelésében. PhD 2017
- Porrogi Pálma: Izoenzim specifikus citokróm P450 aktivitás és indukció gátlás vizsgálatok. PhD 2016
- Temesvári Manna: Személyre szabott gyógyszeres terápia kialakításához szükséges diagnosztikai eljárás kidolgozása. PhD 2013
- Kóhalmy Krisztina: Sztteroid típusú vegyületekkel kiváltott citokróm P450 indukció vizsgálata humán májsejtekben. PhD 2010
- Tamási Viola: Citokróm P450 enzimek *in vitro* és *in vivo* indukciójának vizsgálata regenerálódó májsejtekben. PhD 2004
- Hazai Eszter: Citokróm P450 enzimgátlók szerepe a gyógyszervizsgálatok során. PhD 2003

## 11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Achour B, Barber J, Rostami-Hodjegan A: Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: a meta-analysis. *Drug Metab Dispos* 42(8): 1349-1356, 2014.
2. Aitken AE, Morgan ET: Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 35(9): 1687-1693, 2007.
3. Akakpo JY, Ramachandran A, Jaeschke H: Novel strategies for the treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Exp Opin Drug Metab Toxicol* 16(11): 1039-1050, 2020.
4. Akakpo JY, Ramachandran A, Curry SC, Rumack BH, Jaeschke H: Comparing *N*-acetylcysteine and 4-methylpyrazole as antidotes for acetaminophen overdose. *Arch Toxicol* 96: 453-465, 2022.
5. Alamo C, Lopez-Munoz F: The pharmacological role and clinical applications of antipsychotics' active metabolites: paliperidone versus risperidone. *Clin Exp Pharmacol* 3: 1000117, 2013.
6. Alexander J, Auðunsson GA, Benford D, Cockburn A, Cravedi J-P, Dogliotti E, Di Domenico A, Fernández-Cruz ML, Fürst P, Fink-Gremmels J, Galli CL, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Johansson N, Mutti A, Schlatter J, van Leeuwen R, Van Peteghem C,

- Verger P: Cross-contamination of non-target feedingstuffs by monensin authorised for use as a feed additive. *EFSA Journal* 6(1): 592, 2008.
7. Anderson GD: Gender differences in pharmacological response. *Int Rev Neurobiol* 83: 1-10, 2008.
  8. Bains RK: African variation at cytochrome P450 genes: Evolutionary aspects and the implications for the treatment of infectious diseases. *Evol Med Public Health* 2013(1): 118-134, 2013.
  9. Barnes KJ, Rowland A, Polasek TM, Miners JO: Inhibition of human drug-metabolising cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities *in vitro* by uremic toxins. *Eur J Clin Pharmacol* 70(9): 1097-1106, 2014.
  10. Bayliss KM, Skett P: Isolation and culture of human hepatocytes. *Human Cell Culture Protocols* (Jones GE szerk.) Humana Press, Totowa NJ, 1996, pp. 369-390.
  11. Benedetti SM, Bani M: Design of *in vitro* studies to predict *in vivo* inhibitory drug-drug interactions. *Pharmacol Res* 38(2): 81-88, 1998.
  12. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ, Grivell MB, Halls HJ, Gannon BJ, Friend DS: Initial determination of cell quality. *Isolated Hepatocytes* (Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ, Grivell MB, Halls HJ, Gannon BJ, Friend DS szerk.) Elsevier, Amsterdam, 1991, pp. 45-47.
  13. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach SR, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA; Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Drug Metabolism/Clinical Pharmacology Technical Working Groups: The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *J Clin Pharmacol* 43(5): 443-469, 2003.
  14. Brown DG, Wobst HJ: A decade of FDA-approved drugs (2010-2019): Trends and future directions. *J Med Chem* 64: 2312-2338, 2021.
  15. Buchwald P, Bodor AA: *A gyógynövényektől a megtervezett gyógyszerekig*. Dacia Könyvkiadó, Kolozsvár, 1981.
  16. Burns KE, Goldthorpe MA, Porteus F, Browett P, Helsby NA: CYP2C19 genotype-phenotype discordance in patients with multiple myeloma leads to an acquired loss of drug-metabolising activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 73(3): 651-655, 2014.
  17. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF: Human cytochrome P-450<sub>PA</sub> (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7696-7700, 1989.
  18. Casey AB, Canal CE: Classics in chemical neuroscience: Aripiprazole. *ACS Chem Neurosci* 8:1135-1146, 2017.
  19. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, Scott SA, Rehm HL, Williams MS, Klein TE, Relling MV, Hoffman JM: Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med* 19(2): 215-223, 2017.
  20. Cavallari LH, Jeong H, Bress A: Role of cytochrome P450 genotype in the steps toward personalized drug therapy. *Pharmgenomics Pers Med* 4: 123-136, 2011.
  21. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M: Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010: 479364, 2010.

22. Chevalier D, Cauffiez C, Allorge D, Lo-Guidice JM, Lhermitte M, Lafitte JJ, Broly F: Five novel natural allelic variants - 951A>C, 1042G>A (D348N), 1156A>T (I386F), 1217G>A (C406Y) and 1291C>T (C431Y) - of the human CYP1A2 gene in a French Caucasian population. *Hum Mutat* 17: 355, 2001.
23. Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y Prediction of hepatic clearance in human from *in vitro* data for successful drug development. *AAPS J* 11: 262-276, 2009.
24. Choudhary NS, Saigal S, Bansal RK, Saraf N, Gautam D, Soin AS: Acute and chronic rejection after liver transplantation: What a clinician needs to know. *J Clin Exp Hepatol* 7(4): 358-366, 2017.
25. Chouinard G: Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 5: 7-12, 2004.
26. Christensen H, Hermann M: Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol* 3: 8, 2012.
27. Chung TDY, Terry DB, Smith LH: *In vitro* assessment of ADME and PK properties during lead selection and lead optimization – Guidelines, benchmarks and rules of thumb. *Assay Guidance Manual* (Markosian S, Grossman A, Brimacombe K szerk.) Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2015 (frissítve: 2021), pp. 1385-1398.
28. Coleman RA, Bowen WP, Baines IA, Woodrooffe AJ, Brown AM: Use of human tissue in ADME and safety profiling of development candidates. *Drug Discovery Today* 6: 1116-1126, 2001.
29. Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, Pangalos MN: Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev* 13: 419-431, 2014.
30. Crespi CL, Miller VP, Stresser DM: Design and application of fluorometric assays for human cytochrome P450 inhibition. *Methods Enzymol* 357: 276-284, 2002.
31. Daly AK: Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 45(1): 13-31, 2006.
32. Davies B, Morris T: Physiological parameters in laboratory animals and humans, *Pharm Res* 10: 1093-1095, 1993.
33. Dean L, Kane M: Aripiprazole therapy and *CYP2D6* genotype. *Medical Genetics Summaries* (Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, Esquivel B, Kane MS, Kattman BL, Malheiro AJ szerk.) National Center for Biotechnology Information (US); 2012- (Frissítve: 2021.02.10).
34. Deodhar M, Al Rihani SB, Arwood MJ, Darakjian L, Dow P, Turgeon J, Michaud V: Mechanisms of CYP450 inhibition: Understanding drug-drug interactions due to mechanism-based inhibition in clinical practice. *Pharmaceutics* 12(9): 846, 2020.
35. Deore AB, Dhumane JR, Wagh HV, Sonawane RB: The stages of drug discovery and development process. *Asian J Pharmac Res Dev* 7(6): 62-67, 2019.
36. Djordjevic N, Ghotbi R, Jankovic S, Aklillu E: Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 -163C>A polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 66: 697-703, 2010.
37. Doerksen MJ, Jones RS, Coughtrie MWH, Collier AC: Parameterization of microsomal and cytosolic scaling factors: Methodological and biological considerations for scalar derivation and validation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 46(2): 173-183, 2021.

38. Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I: Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. *J Int Med Res* 46(9): 3979-3990, 2018.
39. Duarte MP, Palma BB, Gilep AA, Laires A, Oliveira JS, Usanov SA, Rueff J, Kranendonk M: The stimulatory role of human cytochrome b<sub>5</sub> in the bioactivation activities of human CYP1A2, 2A6 and 2E1: a new cell expression system to study cytochrome P450 mediated biotransformation. *Mutagenesis* 20(2): 93-100, 2005.
40. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Bampidis, V, Azimonti G, Bastos M, Christensen H, Dusemund B, Durjava MK, Lopez-Alonso M, Puente SL, Marcon F, Mayo B, Pechova A, Petkova M, Ramos F, Sanz Y, Villa RE, Woutersen R, Bories G, Brantom P, Gropp J, Finizio A, Focks A, Teodorovic I, Glandorf B, Herman L, Maradona MP, Holzkecht O, Tarres-Call J, Vettori MV, Kouba M: Safety and efficacy of Elancoban (R) G200 (monensin sodium) for chickens for fattening, chickens reared for laying and turkeys. *EFSA Journal* 17(12): e05891, 2019.
41. El-Sankary W, Gibson GG, Ayrton A, Plant N: Use of a reporter gene assay to predict and rank the potency and efficacy of CYP3A4 inducers. *Drug Metab Dispos* 29: 1499-1504, 2001.
42. Fang H, Wang X, Hou K, Zhang Y, Shao S, Zhang G, Feng Y, Huang L: The association of adjusted plasma valproic acid concentration with *CYP2C9* gene polymorphism in patients with epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Ann Transl Med* 9(10): 846, 2021.
43. Fang J, Coutts RT, McKenna KF, Baker GB: Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 592-599, 1998.
44. Fanni D, Pinna F, Gerosa C, Paribello P, Carpinello B, Faa G, Manchia M: Anatomical distribution and expression of CYP in humans: Neuropharmacological implications. *Drug Dev Res* 82(5): 628-667, 2021.
45. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jetté N: Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 88(3): 296-303, 2017.
46. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S: ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55(4): 475-482, 2014.
47. Fogarasi A, Neuwirth M, Gyorsok Z, Czirják S, Vajda J, Bognár L: Epilepsy surgery in childhood: theory and practice. *Orv Hetil* 144(48): 2359-2365, 2003.
48. Fowler S, Morcos PN, Cleary Y, Martin-Facklam M, Parrott N, Gertz M, Yu L: Progress in prediction and interpretation of clinically relevant metabolic drug-drug interactions: a minireview illustrating recent developments and current opportunities. *Curr Pharmacol Rep* 3(1): 36-49, 2017.
49. Franco V, Perucca E: The pharmacogenomics of epilepsy. *Expert Rev Neurother* 15: 1161-1170, 2015.
50. Fricke-Galindo I, Céspedes-Garro C, Rodrigues-Soares F, Naranjo ME, Delgado Á, de Andrés F, López-López M, Peñas-Lledó E, Llerena A: Interethnic variation of *CYP2C19* alleles, 'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics J* 16(2): 113-123, 2016.



51. Friede KA, Ginsburg GS, Voora D: Gene expression signatures and the spectrum of coronary artery disease. *J Cardiovasc Transl Res* 8: 339-352, 2015.
52. Fujino C, Sanoh S, Katsura T: Variation in expression of cytochrome P450 3A isoforms and toxicological effects: Endo- and exogenous substances as regulatory factors and substrates. *Biol Pharm Bull* 44(11): 1617-1634, 2021.
53. Furberg CD, Pitt B: Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2(5): 205-207, 2001.
54. Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE; PharmVar Steering Committee: The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. *Clin Pharmacol Ther* 103(3): 399-401, 2018.
55. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, Altman RB, Klein TE: Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 23(4): 236-241, 2013.
56. Ghotbi R, Christensen M, Roh H-K, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L: Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 63: 537-546, 2007.
57. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7. kiadás, Macmillan Publishing Company, New York, 1985.
58. Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B, Russ A, Banati P, Kozlak M, Smolenski S, Goble R: Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicol Sci* 66: 185-200, 2002.
59. Go AS: Cardiovascular disease consequences of CKD. *Semin Nephrol* 36(4): 293-304, 2016.
60. Gotoh S, Ohno M, Yoshinari K, Negishi M, Kawajiri K: Nuclear receptor-mediated regulation of cytochrome P450 genes. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. (Ortiz de Montellano PR szerk.) Springer, Heidelberg 2015, pp. 787-812.
61. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ: Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 261: 5051-5060, 1986.
62. Guengerich FP: Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21: 70-83, 2008.
63. Guengerich FP: Human cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. (Ortiz de Montellano PR szerk.) Springer, Heidelberg 2015, pp. 523-785.
64. Guerrini, R: Valproate as a mainstay of therapy for pediatric epilepsy. *Paediatr Drugs* 8: 113-129, 2006.
65. Hahn M, Roll SC: The influence of pharmacogenetics on the clinical relevance of pharmacokinetic drug-drug interactions: drug-gene, drug-gene-gene and drug-drug-gene interactions. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(5): 487, 2021.
66. Hakkola J, Bernasconi C, Coecke S, Richert L, Andersson TB, Pelkonen O: Cytochrome P450 induction and xeno-sensing receptors pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, aryl hydrocarbon receptor and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  at the

crossroads of toxicokinetics and toxicodynamics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 123 Suppl 5: 42-50, 2018.

67. Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O: Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Arch Toxicol* 94(11): 3671-3722, 2020.
68. Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R: Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* 1770(3): 330-344, 2007.
69. Hägglöf I, Holmgren A: Regulatory affairs. *Drug Discovery and Development. Technology Transition*. (Rang HP, Hill RG szerk.) Elsevier, London, 2013, pp. 285-301.
70. He ZX, Chen XW, Zhou ZW, Zhou SF: Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. *Drug Metab Rev* 47(4): 470-519, 2015.
71. Hein DW: *N*-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5(4): 353-366, 2009.
72. Hein DW, Millner LM: Arylamine *N*-acetyltransferase acetylation polymorphisms: paradigm for pharmacogenomic-guided therapy - a focused review. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 17(1): 9-21, 2021.
73. Herrero MJ, Megias J, Bosó V, Ruiz J, Rojas L, Sanchez-Lazaro I, Amemar L, Hernandez J, Poveda JL, Pastor A, Solé A, Lopez-Andujar R, Alino SF: Pharmacogenetics of immunosuppressants in solid organ transplantation: Time to implement in the clinic. *Frontiers in Transplantology* (Abdeldayem H, El-Kased AF, El-Shaarawy A ed.) InTechOpen, 2016 pp. 99-131.
74. Hewitt NJ, Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG: Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39(1): 159-234, 2007.
75. Heyn H, White RB, Stevens JC: Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the *N*-demethylation of *S*-mephenytoin. *Drug Metab Dispos* 24: 948-954, 1996.
76. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgl R, Zernig G: AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 44: 195-235, 2011.
77. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschgl R, Zernig G, Zurek G, Baumann P: Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry* 51(01-02): 6-92, 2018.
78. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD: Global prevalence of chronic kidney disease - A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 11(7): e0158765, 2016.

79. van der Hoeven TA, Coon MJ: Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem* 249: 6302-6310, 1974.
80. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR: Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* 269(12): 1513-1518, 1993.
81. Huang W, Lin YS, McConn DJ 2nd, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, Glodowski M, Thummel KE: Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 32(12): 1434-1445, 2004.
82. Huang SM, Lesko LJ: Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned? *J Clin Pharmacol* 44(6): 559-569, 2004.
83. Hukkanen J: Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human *in vivo* findings. *Expert Rev Clin Pharmacol* 5(5): 569-585, 2012.
84. Iannaccone T, Sellitto C, Manzo V, Colucci F, Giudice V, Stefanelli B, Iuliano A, Corrivetti G, Filippelli A: Pharmacogenetics of carbamazepine and valproate: Focus on polymorphisms of drug metabolizing enzymes and transporters. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(3): 204, 2021.
85. Ing Lorenzini K, Desmeules J, Rollason V, Bertin S, Besson M, Daali Y, Samer CF: CYP450 genotype-phenotype concordance using the Geneva micrococktail in a clinical setting. *Front Pharmacol* 12: 730637, 2021.
86. Ingelman-Sundberg M: Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharm J* 5(1): 6-13, 2005.
87. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 116(3): 496-526, 2007.
88. Ingelman-Sundberg M, Sim SC: Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 90-94, 2010.
89. Iniesta I: Hippocratic Corpus. *BMJ* 342: d688, 2011.
90. Ioannides C: Xenobiotic metabolism: An overview. *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. (Ioannides C szerk.) John Wiley & Sons, Ltd., Chichester UK, 2001, pp. 1-32.
91. Jain KK: Applications of AmpliChip CYP450. *Mol Diagn* 9(3): 119-127, 2005.
92. John AP, Kecanovic A: Unusually high serum levels of clozapine associated with genetic polymorphism of CYP3A enzymes. *Asian J Psychiatr* 57: 102126, 2021
93. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmüller J, Oellerich M, Armstrong VW, Wojnowski L: Contribution of CYP3A5 to the *in vitro* hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 51(8): 1374-1381, 2005.
94. Kane JM, Kim E, Kan HJ, Guo Z, Bates JA, Whitehead R, Pikalov A: Comparative utility of aripiprazole and haloperidol in schizophrenia: post hoc analysis of two 52-week, randomized, controlled trials. *Appl Health Econ Health Policy* 7(2): 109-119, 2009.

95. Kantae V, Krekels EHJ, Esdonk MJV, Lindenburg P, Harms AC, Knibbe CAJ, Van der Graaf PH, Hankemeier T: Integration of pharmacometabolomics with pharmacokinetics and pharmacodynamics: towards personalized drug therapy. *Metabolomics* 13(1): 9, 2017.
96. Karamichos D, Escandon P, Vasini B, Nicholas SE, Van L, Dang DH, Cunningham RL, Riaz KM: Anterior pituitary, sex hormones, and keratoconus: Beyond traditional targets. *Prog Retin Eye Res* 88: 101016, 2022.
97. Kazmi SR, Jun R, Yu M-S, Jung C, Na D: *In silico* approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. *Comput Biol Med* 106: 54-64, 2019.
98. Khanna I: Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Disc Today* 17(19/20): 1088-1102, 2012.
99. Kiang TKL, Ho PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TKH: Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the *CYP2C9\*1/\*1* genotype. *Toxicol Sci* 94(2): 261-271, 2006.
100. Kim TH, Shin S, Shin BS: Model-based drug development: application of modeling and simulation in drug development. *J Pharm Investig* 48: 431-441, 2018.
101. Kirschbaum KM, Müller MJ, Malevani J, Mobascher A, Burchardt C, Piel M, Hiemke C: Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry* 9: 212-218, 2008.
102. Klinge CM, Clark BJ, Prough RA: Dehydroepiandrosterone research: Past, current, and future. *Vitam Horm* 108: 1-28, 2018.
103. Klomp SD, Manson ML, Guchelaar HJ, Swen JJ: Phenoconversion of cytochrome P450 metabolism: A systematic review. *J Clin Med* 9(9): 2890, 2020.
104. Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL: *In vitro* drug metabolism using liver microsomes. *Curr Protoc Pharmacol* 74: 7.8.1-7.8.24, 2016.
105. Kobayashi K, Yamanaka Y, Iwazaki N, Nakajo I, Hosokawa M, Negishi M, Chiba K: Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos* 33: 924-929, 2005.
106. Kocarek TA, Dahn MS, Cai H, Strom SC, Mercer-Haines NA: Regulation of CYP2B6 and CYP3A4 expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in primary cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 30: 1400-1405, 2002.
107. Kola I, Landis J: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3(8): 711-716, 2004.
108. Koop DR, Laethem CL, Tierney DJ: The utility of *p*-nitrophenol hydroxylation in P450III1 analysis. *Drug Metab Rev* 20(2-4): 541-551, 1989.
109. Kovács G: A szkizofrénia gyógyszeres kezelése. *Neuropsychopharmacol Hung* 13(4): 239-247, 2011.
110. Krajcsi P: Drug-transporter interaction testing in drug discovery and development. *World J Pharmacol* 2(1): 35-46, 2013.
111. Kremers P: Can drug-drug interactions be predicted from *in vitro* studies? *Sci World J* 2: 751-766, 2002.
112. Kronbach T, Mathys D, Gut J, Catin T, Meyer UA: High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal Biochem* 162: 24-32, 1987.

113. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer U: Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III<sub>A4</sub>. *Mol Pharmacol* 36: 89-96, 1989.
114. Kurzawski M, Drozdziak M. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: genes involved in mechanism of action and pharmacokinetics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics* 14: 1099-1118, 2013.
115. Lai XS, Yang LP, Li XT, Liu JP, Zhou ZW, Zhou SF: Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. *Curr Drug Metab* 10(9): 1009-1047, 2009.
116. Lameh J, Burstein ES, Taylor E: Pharmacology of *N*-desmethylclozapine. *Pharmacol Ther* 115: 223-231, 2007.
117. Langhammer AJ, Nilsen OG: Fennel and raspberry leaf as possible inhibitors of acetaminophen oxidation. *Phytother Res* 28: 1573-1576, 2014.
118. Lea-Henry TN, Carland JE, Stocker SL, Sevastos J, Roberts DM: Clinical pharmacokinetics in kidney disease: Fundamental principles. *Clin J Am Soc Nephrol* 13(7): 1085-1095, 2018.
119. Lenoir C, Rollason V, Desmeules JA, Samer CF: Influence of inflammation on cytochromes P450 activity in adults: A systematic review of the literature. *Front Pharmacol* 12: 733935, 2021.
120. de Leon J, Diaz FJ: A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res* 76: 135-157, 2005.
121. Leucht S, Busch R, Kissling W, Kane JM: Early prediction of antipsychotic nonresponse among patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 68: 352-360, 2007.
122. Lewis DFV: *Guide to Cytochromes P450. Structure and Function*. Taylor & Francis, London, 2001.
123. Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, Cheng LC, Jurima-Romet M: Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* 107(1-2): 5-16, 1997.
124. Lombardo FC, Ravaynia PS, Modena MM, Hierlemann A, Keiser J: Evaluation of human liver microtissues for drug screening on *Schistosoma mansoni* Schistosomula. *ACS Infect Dis* 7(7): 1894-1900, 2021.
125. Ing Lorenzini K, Desmeules J, Rollason V, Bertin S, Besson M, Daali Y, Samer CF: CYP450 genotype-phenotype concordance using the Geneva micrococktail in a clinical setting. *Front Pharmacol* 12: 730637, 2021.
126. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with Folin reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
127. Lu C, Di L: *In vitro* and *in vivo* methods to assess pharmacokinetic drug-drug interactions in drug discovery and development. *Biopharm Drug Dispos* 41(1-2): 3-31, 2020.
128. Lu ML, Lane HY, Chen KP, Jann MW, Su MH, Chang WH: Fluvoxamine reduces the clozapine dosage needed in refractory schizophrenic patients. *Clin Psychiatry* 61: 594-599, 2000.
129. Lu ML, Lane HY, Lin SK, Chen KP, Chang WH: Adjunctive fluvoxamine inhibits clozapine-related weight gain and metabolic disturbances. *J Clin Psychiatry* 65: 766-771, 2004.

130. Ludwig E, Schmid J, Beschke K, Ebner T: Activation of human cytochrome P-450 3A4-catalyzed meloxicam 5'-methylhydroxylation by quinidine and hydroquinidine *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 290(1): 1-8, 1999.
131. Magro L, Arzenton E, Leone R, Stano MG, Vezzaro M, Rudolph A, Castagna I, Moretti U: Identifying and characterizing serious adverse drug reactions associated with drug-drug interactions in a spontaneous reporting database. *Front Pharmacol* 11: 622862, 2021.
132. Mandagere AK: Strategies in lead selection and optimization: Application of a graphical model and automated *in vitro* ADME screening. *Pharmacokinetic Challenges in Drug Discovery*. (Pelkonen O, Baumann A, Reichel A szerk.) Springer-Verlag, Berlin, 2002, pp. 185-202.
133. Manikandan P, Nagini S: Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A review. *Curr Drug Targets* 19(1): 38-54, 2018.
134. Mann B, Melton R, Thompson D: Drug metabolism in drug discovery and preclinical development. *Drug Metabolism* (Dunnington K szerk.) IntechOpen, London, 2021, pp. 1-14.
135. Martinez MN, Antonovic L, Court M, Dacasto M, Fink-Gremmels J, Kukanich B, Locuson C, Mealey K, Myers MJ, Trepanier L: Challenges in exploring the cytochrome P450 system as a source of variation in canine drug pharmacokinetics, *Drug Metab Rev* 45: 218-230, 2013.
136. Masuda S, Inui K: An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 112(1): 184-198, 2006.
137. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S: Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 27(6): 653-657, 2012.
138. Mauri MC, Volonteri LS, Colasanti A, Fiorentini A, De Gaspari IF, Bareggi SR: Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics: a critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response. *Clin Pharmacokinet* 46: 359-388, 2007.
139. McDonagh EM, Boukouvala S, Aklillu E, Hein DW, Altman RB, Klein TE: PharmGKB summary: very important pharmacogene information for N-acetyltransferase 2. *Pharmacogenet Genomics* 24: 409-425, 2014.
140. Mei S, Feng W, Zhu L, Yu Y, Yang W, Gao B, Wu X, Zhao Z, Fang F: Genetic polymorphisms and valproic acid plasma concentration in children with epilepsy on valproic acid monotherapy. *Seizure* 51: 22-26, 2017.
141. Mendonça Júnior FJ, Scotti L, Ishiki H, Botelho SP, Da Silva MS, Scotti MT: Benzo- and thienobenzo-diazepines: multi-target drugs for CNS disorders. *Mini Rev Med Chem* 15: 630-647, 2015.
142. Michalets EL, Williams CR: Drug interactions with cisapride: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 39(1): 49-75, 2000.
143. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Désy F, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17(11): 3041-3048, 2006.
144. Mikudina B, Érsek K, Arányi Zs, Juhos V, Gulácsi L: Epilepszia betegségteher felmérés Magyarországon. *Gondolatok közös javainkról*. A Budapesti Corvinus Egyetem, Közgazdaságtudományi Kar 2010. évi konferenciája (Budapest, 2010.04.27) 2011, pp. 179-187.

145. Miller CH, Fleischhacker WW: Managing antipsychotic-induced acute and chronic akathisia. *Drug Saf* 22: 73-81, 2000.
146. Miners JO, Birkett DJ: Use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic cytochrome P450 2C9. *Methods Enzymol* 272: 139-145, 1996.
147. Mohs RC, Greig NH: Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement (N Y)* 3(4): 651-657, 2017.
148. Momper JD, Venkataramanan R, Nolin TD: Nonrenal drug clearance in CKD: Searching for the path less traveled. *Adv Chronic Kidney Dis* 17(5): 384-391, 2010.
149. Monostory K, Vereczkey L: *In vitro - in vivo* correlation of CYP1A induction. *Exp Toxicol Pathol* 48 suppl II: 291-294, 1996.
150. Moorthy B, Sriram P, Pathak DN, Bodell WJ, Raderath K: Tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed *in vivo*. *Cancer Res* 56: 53-57, 1996.
151. Mroz P, Michel S, Allen JD, Meyer T, McGonagle EJ, Carpentier R, Vecchia A, Schlichte A, Bishop JR, Dunnenberger HM, Yohe S, Thyagarajan B, Jacobson PA, Johnson SG: Development and implementation of in-house pharmacogenomic testing program at a major academic health system. *Front Genet* 12: 712602, 2021.
152. Mullen Grey AK, Riddick DS: Glucocorticoid and adrenalectomy effects on the rat aryl hydrocarbon receptor pathway depend on the dosing regimen and post-surgical time. *Chem-Biol Interact* 182:148-158, 2009.
153. Murphy CS, Parker CJ, McCague R, Jordan CV: Structure-activity relationships of nonisomerizable derivatives of tamoxifen: importance of hydroxyl group and side chain positioning for biological activity. *Mol Pharmacol* 39: 421-428, 1991.
154. Musunuru K, Ingelsson E, Fornage M, Liu P, Murphy AM, Newby LK, Newton-Cheh C, Perez MV, Voora D, Woo D; American Heart Association Committee on Molecular Determinants of Cardiovascular Health of the Council on Functional Genomics and Translational Biology and Council on Epidemiology and Prevention; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Clinical Cardiology; and Stroke Council: The expressed genome in cardiovascular diseases and stroke: Refinement, diagnosis, and prediction: A scientific statement from the American Heart Association. *Circ Cardiovasc Genet* 10(4). pii: e000037, 2017.
155. Nanau RM, Neuman MG: Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem* 46(15): 1323-1338, 2013.
156. Nardi AE, Perna G: Clonazepam in the treatment of psychiatric disorders: an update. *Int Clin Psychopharmacol* 21: 131-142, 2006.
157. Nardi AE, Freire RC, Valença AM, Amrein R, de Cerqueira AC, Lopes FL, Nascimento I, Mezzasalma MA, Veras AB, Sardinha A, de Carvalho MR, da Costa RT, Levitan MN, de-Melo-Neto VL, Soares-Filho GL, Versiani M: Tapering clonazepam in patients with panic disorder after at least 3 years of treatment. *J Clin Psychopharmacol* 30: 290-293, 2010.
158. Nelson DR: Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Cytochrome P450 Protocols* (Phillips IR, Shephard EA szerk.) *Methods in Molecular Biology* vol. 320, Humana Press, Totowa NJ, 2006, pp. 1-10.

159. Nemes B, Szederkényi E, Nagy KK, Hartyánszky I, Ablonczy L, Vámos FR, Mihály S, Máthé Z: A summary of transplantation activity in Hungary. *Transplant Proc* 51(4): 1202-1208, 2019.
160. Niklas J, Diaz Ochoa JG, Bucher J, Mauch K: Quantitative evaluation and prediction of drug effects and toxicological risk using mechanistic multiscale models. *Mol Inform* 32: 14-23, 2013.
161. Niwa T, Inoue-Yamamoto S, Shiraga T, Takagi A: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 1813-1816, 2005.
162. Niwa T, Yamazaki H: Comparison of cytochrome P450 2C subfamily members in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. *Curr Drug Metab* 13(8): 1145-1159, 2012.
163. Obach RS: Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27: 1350-1359, 1999.
164. Ojo AO: Renal disease in recipients of nonrenal solid organ transplantation. *Semin Nephrol* 27(4): 498-507, 2007.
165. Olesen OV, Linnet K: Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the *N*-demethylation of clozapine *in vitro* at low and high concentrations. *J Clin Pharmacol* 41: 823-832, 2001.
166. Olivera M, Martínez C, Gervasini G, Carrillo JA, Ramos S, Benítez J, García-Martin E, Agúndez JA: Effect of common NAT2 variant alleles in the acetylation of the major clonazepam metabolite, 7-aminoclonazepam. *Drug Metab Lett* 1: 3-5, 2007.
167. Omura T, Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378, 1964.
168. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB: Schizophrenia. *Lancet* 388(10039): 86-97, 2016.
169. Pantaleão SQ, Fernandes PO, Gonçalves JE, Maltarollo VG, Honorio KM: Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: A review. *ChemMedChem* 17(1): e202100542, 2022.
170. Pariante A, Dartigues JF, Benichou J, Letenneur L, Moore N, Fourrier-Réglat A: Benzodiazepines and injurious falls in community dwelling elders. *Drugs Aging* 25: 61-70, 2008.
171. Parkinson A, Kazmi F, Buckley DB, Yerino P, Ogilvie BW, Paris BL: System-dependent outcomes during the evaluation of drug candidates as inhibitors of cytochrome P450 (CYP) and uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes: human hepatocytes versus liver microsomes versus recombinant enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet* 25(1): 16-27, 2010.
172. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ: Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 274(3): 707-713, 2000.
173. Pascussi JM, Busson-Le Coniat M, Maurel P, Vilarem MJ: Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol Endocrinol* 17(1): 42-55, 2003a.



174. Pascussi JM, Dvorák Z, Gerbal-Chaloin S, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ: Pathophysiological factors affecting CAR gene expression. *Drug Metab Rev* 35(4): 255-268, 2003b.
175. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P: The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 1-32, 2008.
176. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82(10): 667-715, 2008.
177. Pelkonen O, Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M: CYP-associated drug-drug interactions: A mission accomplished? *Arch Toxicol* 94(11): 3931-3934, 2020.
178. Perera V, Gross AS, McLachlan AJ: Influence of environmental and genetic factors on CYP1A2 activity in individuals of South Asian and European ancestry. *Clin Pharmacol Ther* 92: 511-519, 2012.
179. Peter R, Böcker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS: Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol* 3: 566-573, 1990.
180. Peterson GM, Naunton M. Valproate: a simple chemical with so much to offer. *J Clin Pharm Ther* 30(5): 417-421, 2005.
181. Petrovska BB: Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 6(11): 1-5, 2012.
182. Polasek TM, Lin FP, Miners JO, Doogue MP: Perpetrators of pharmacokinetic drug-drug interactions arising from altered cytochrome P450 activity: a criteria-based assessment. *Br J Clin Pharmacol* 71(5): 727-736, 2011.
183. Polcwiartek C, Nielsen J: The clinical potentials of adjunctive fluvoxamine to clozapine treatment: a systematic review. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 741-750, 2016.
184. Prakash C, Kamel A, Cui D, Whalen RD, Miceli JJ, Tweedie D: Identification of the major human liver cytochrome P450 isoform(s) responsible for the formation of the primary metabolites of ziprasidone and prediction of possible drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* 49 Suppl 1: 35S-42S, 2000.
185. Prough RA, Clark BJ, Klinge CM: Novel mechanisms for DHEA action. *J Mol Endocrinol* 56(3): R139-155, 2016.
186. Rang HP, Hill RG: Drug development: Introduction. *Drug Discovery and Development. Technology Transition*. (Rang HP, Hill RG szerk.) Elsevier, London, 2013a, pp. 203-209.
187. Rang HP, Hill RG: Drug discovery and development: facts and figures. *Drug Discovery and Development. Technology Transition*. (Rang HP, Hill RG szerk.) Elsevier, London, 2013b, pp. 321-334.
188. Rao KV, Johnson WD, Bosland MC, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ, McCormick DL: Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by early and delayed administration of dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* 59(13): 3084-3089, 1999.
189. Reinke LA, Moyer MJ: *p*-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* 13(5): 548-552, 1985.

190. Rendic S, Di Carlo FJ: Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 29(1-2): 413-580, 1997.
191. Rendic S: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34(1-2): 83-448, 2002.
192. Rendic S, Guengerich FP: Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol* 25(7): 1316-1383, 2012.
193. Rendic S, Guengerich FP: Human Family 1-4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update. *Arch Toxicol* 95(2): 395-472, 2021.
194. Ripp SL, Fitzpatrick JL, Peters JM, Prough RA: Induction of CYP3A expression by dehydroepiandrosterone: involvement of the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 30(5): 570-575, 2002.
195. Ripp SL, Falkner KC, Pendleton ML, Tamasi V, Prough RA: Regulation of CYP2C11 by dehydroepiandrosterone and peroxisome proliferators: identification of the negative regulatory region of the gene. *Mol Pharmacol* 64(1): 113-122, 2003.
196. Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S: Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand* 118: 69-86, 2008.
197. Roberts DM, Sevastos J, Carland JE, Stocker SL, Lea-Henry TN: Clinical pharmacokinetics in kidney disease: Application to rational design of dosing regimens. *Clin J Am Soc Nephrol* 13(8): 1254-1263, 2018.
198. Rodriguez-Antona C, Savieo JL, Lauschke VM, Sangkuhl K, Drögemöller BI, Wang D, van Schaik RHN, Gilep AA, Peter AP, Boone EC, Ramey BE, Klein TE, Whirl-Carrillo M, Pratt VM, Gaedigk A: PharmVar GeneFocus: CYP3A5. *Clin Pharmacol Ther* 2022. doi: 10.1002/cpt.2563.
199. Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I: Functional significance of a C→A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 *CYP1A2* gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 47: 445-449, 1999.
200. Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Study Group: Polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP1A2* gene (*CYP1A2*) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 55(1): 68-76, 2003.
201. Santes-Palacios R, Ornelas-Ayala D, Cabañas N, Marroquín-Pérez A, Hernández-Magaña A, Del Rosario Olguín-Reyes S, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ: Regulation of human cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A plausible target for chemoprevention? *Biomed Res Int* 2016: 5341081, 2016.
202. Scandlyn MJ, Stuart EC, Rosengren RJ: Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4(4): 413-424, 2008.
203. Sevrioukova IF, Poulos TL: Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans* 42(9): 3116-3126, 2013.
204. Shah KR, Beuhler MC: Fomepizole as an adjunctive treatment in severe acetaminophen toxicity. *Am J Emerg Med* 38(2): 410.e5-410.e6, 2020.

205. Shah KR, Fox C, Geib AJ, Murphy C, Kopec K, Kerns Ii W, Dulaney A, Beuhler MC: Fomepizole as an adjunctive treatment in severe acetaminophen ingestions: a case series. *Clinical Toxicology (Phila)* 59(1):71-72, 2021.
206. Shah RR, Smith RL: Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol* 79(2): 222-240, 2015a.
207. Shah RR, Smith RL: Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos* 43(3): 400-410, 2015b.
208. Shah RR, Gaedigk A, LLerena A, Eichelbaum M, Stingl J, Smith RL: CYP450 genotype and pharmacogenetic association studies: a critical appraisal. *Pharmacogenomics* 17(3): 259-275, 2016.
209. Shekhani R, Steinacher L, Swen JJ, Ingelman-Sundberg M: Evaluation of current regulation and guidelines of pharmacogenomic drug labels: Opportunities for improvements. *Clin Pharmacol Ther* 107(5): 1240-1255, 2020.
210. Sherratt AJ, Banet DE, Prough RA: Glucocorticoid regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon induction of cytochrome P450IA1, glutathione *S*-transferases, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured fetal rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 37(2): 198-205, 1990.
211. Shukla R, Handa M, Pardhi VP: Introduction to pharmaceutical product development. *Pharmaceutical Drug Product Development and Process Optimization* (Beg S, Rahman M, Imam SS, Alruwaili NK, Robaian MA, Panda SK szerk.) Apple Academic Press Inc., Palm Bay FL, 2020, pp. 1-32.
212. Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiten JP, IJlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I: Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis* 31(2): 205-216, 2008.
213. Sim SC, Ingelman-Sundberg M: Pharmacogenomic biomarkers: new tools in current and future drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 32(2): 72-81, 2011.
214. Singleton DW, Lei XD, Webb SJ, Prough RA, Geoghegan TE: Cytochrome P-450 mRNAs are modulated by dehydroepiandrosterone, nafenopin, and triiodothyronine. *Drug Metab Dispos* 27(2): 193-200, 1999.
215. Sohlenius-Sternbeck AK: Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements, *Toxicol In Vitro* 20: 1582-1586, 2006.
216. Solecki RS: Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in Northern Iraq. *Science* 190: 880-881, 1975.
217. Srivastava PK, Yun C-H, Beaune PH, Ged C, Guengerich FP: Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (*S*)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol Pharmacol* 40: 69-79, 1991.
218. Staatz C, Taylor P, Tett S: Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 16(9): 1905-1909, 2001.
219. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R; French Society of Pharmacology and Therapeutics: Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacol Ther* 215: 107627, 2020.

220. Sudsakorn S, Bahadduri P, Fretland J, Lu C: 2020 FDA drug-drug interaction guidance: A comparison analysis and action plan by pharmaceutical industrial scientists. *Curr Drug Metab* 21(6): 403-426, 2020.
221. Swainston Harrison T, Perry CM: Aripiprazole: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Drugs* 64(15): 1715-1736, 2004.
222. Swen JJ, Nijenhuis M, van Rhenen M, de Boer-Veger NJ, Buunk AM, Houwink EJJ, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RHN, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VHM, Guchelaar HJ; Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) of the Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP): Pharmacogenetic information in clinical guidelines: The European perspective. *Clin Pharmacol Ther* 103(5): 795-801, 2018.
223. Tanaka E: *In vivo* age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *J Clin Pharm Ther* 23(4): 247-255, 1998.
224. Tanner JA, Tyndale RF: Variation in CYP2A6 activity and personalized medicine. *J Pers Med* 7(4): 18, 2017.
225. Teh LK, Bertilsson L: Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet* 27(1): 55-67, 2012.
226. Thomas JE, Caballero J, Harrington CA: The incidence of akathisia in the treatment of schizophrenia with aripiprazole, asenapine and lurasidone: a meta-analysis. *Curr Neuropharmacol* 13: 681-691, 2015.
227. Tihanyi K, Bakk ML, Hellinger E, Vastag M: CYP inhibition-mediated drug-drug interactions, *Curr Enzyme Inhibition* 6(3): 130-145, 2010.
228. Tornio A, Filppula AM, Niemi M, Backman JT: Clinical studies on drug-drug interactions involving metabolism and transport: Methodology, pitfalls, and interpretation. *Clin Pharmacol Ther* 105(6): 1345-1361, 2019.
229. Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O: The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors *in vitro*, *in vivo* and *in silico*. *Curr Drug Metab* 7(7): 705-714, 2006.
230. Uludag IF, Bilgin S, Zorlu Y, Tuna G, Kirkali G: Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. *Seizure* 22(6): 457-461, 2013.
231. Varnai R, Szabo I, Tarlos G, Szentpeteri LJ, Sik A, Balogh S, Sipeky C: Pharmacogenomic biomarker information differences between drug labels in the United States and Hungary: implementation from medical practitioner view. *Pharmacogenomics J* 20(3): 380-387, 2020.
232. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, Scheller D, Ersfeld D, Frick M, Fitzsimmons WE, Virji M, Jain A, Brayman KL, Shaked A: Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 41(5): 542-551, 2001.
233. Wang SH, Liang CT, Liu YW, Huang MC, Huang SC, Hong WF, Su JG: Crosstalk between activated forms of the aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor. *Toxicology* 262: 87-97, 2009.
234. Waring RH: Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica* 50(1): 9-18, 2020.
235. van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ: The effect of smoking and cytochrome P450 *CYP1A2* genetic polymorphism on clozapine clearance and dose requirement. *Pharmacogenetics* 13: 169-172, 2003.

236. Wenthur CJ, Lindsley CW: Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS Chem Neurosci* 4(7): 1018-1025, 2013.
237. White PF: *Perioperative Drug Manual*. 2. kiadás, Elsevier, Philadelphia PA, 2005.
238. Wiciński M, Węclewicz MM: Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring. *Curr Opin Hematol* 25(1): 22-28, 2018.
239. Wienkers LC, Heath TG: Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* 4(10): 825-833, 2005.
240. de Wildt SN, Tibboel D, Leeder JS: Drug metabolism for the paediatrician. *Arch Dis Child* 99(12): 1137-1142, 2014.
241. Wilkening S, Stahl F, Bader A: Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 31(8): 1035-1042, 2003.
242. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA: Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30(8): 883-891, 2002.
243. Wiśniowska B, Tylutki Z, Wyszogrodzka G, Polak S: Drug-drug interactions and QT prolongation as a commonly assessed cardiac effect - comprehensive overview of clinical trials. *BMC Pharmacol Toxicol* 17: 12, 2016.
244. van der Wouden CH, Cambon-Thomsen A, Cecchin E, Cheung KC, Dávila-Fajardo CL, Deneer VH, Dolžan V, Ingelman-Sundberg M, Jönsson S, Karlsson MO, Kriek M, Mitropoulou C, Patrinos GP, Pirmohamed M, Samwald M, Schaeffeler E, Schwab M, Steinberger D, Stingl J, Sunder-Plassmann G, Toffoli G, Turner RM, van Rhenen MH, Swen JJ, Guchelaar HJ; Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium: Implementing pharmacogenomics in Europe: Design and implementation strategy of the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium. *Clin Pharmacol Ther* 101(3): 341-358, 2017.
245. Xiao GH, Pinaire JA, Rodrigues AD, Prough RA: Regulation of the Ah gene battery via Ah receptor-dependent and independent processes in cultured adult rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 23(6): 642-650, 1995.
246. Xu ZY, Guo HL, Li L, Zhang M, Jing X, Xu ZJ, Qiu JC, Lu XP, Ding XS, Chen F, Xu J: Genetic and non-genetic factors contributing to the significant variation in the plasma trough concentration-to-dose ratio of valproic acid in children with epilepsy. *Front Pediatr* 8: 599044, 2021.
247. Yamamoto T, Suzuki A, Kohno Y: High-throughput screening to estimate single or multiple enzymes involved in drug metabolism: microtitre plate assay using a combination of recombinant CYP2D6 and human liver microsomes. *Xenobiotica* 33:823-839, 2003.
248. Yamamoto Y, Takahashi Y, Imai K, Mishima N, Yazawa R, Inoue K, Itoh K, Kagawa Y, Inoue Y: Risk factors for hyperammonemia in pediatric patients with epilepsy. *Epilepsia* 54(6): 983-989, 2013.
249. Yamazaki H, Shimada T: Comparative studies of *in vitro* inhibition of cytochrome P4503A4-dependent testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation by roxithromycin and its metabolites, troleandomycin, and erythromycin. *Drug Metab Dispos* 26: 1053-1057, 1998.
250. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, Wiman B, de Faire U, Rane A: Linkage between the *CYP2C8* and *CYP2C9* genetic polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 25-28, 2002.

251. Yeung CK, Shen DD, Thummel KE, Himmelfarb J: Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int* 85(3): 522-528, 2014.
252. Yoo SE, Yi M, Kim WY, Cho SA, Lee SS, Lee SJ, Shin JG. Influences of cytochrome b5 expression and its genetic variant on the activity of CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4. *Drug Metab Pharmacokinet* 34(3): 201-208, 2019.
253. Yu N, Di Q, Hu Y, Zhang YF, Su LY, Liu XH, Li LC: A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in the plasma of epileptic patients with recent seizure. *Neurosci Lett* 514(1): 110-115, 2012.
254. Yusufi B, Mukherjee S, Flanagan R, Paton C, Dunn G, Page E, Barnes TR: Prevalence and nature of side effects during clozapine maintenance treatment and the relationship with clozapine dose and plasma concentration. *Int Clin Psychopharmacol* 22(4): 238-243, 2007.
255. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M: Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392(6): 1093-1108, 2008.
256. Zanger UM, Schwab M: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138(1): 103-141, 2013.
257. Zanger UM, Klein K, Thomas M, Rieger JK, Tremmel R, Kandel BA, Klein M, Magdy T: Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 95(3): 258-261, 2014.
258. Zhang H, Davis CD, Sinz MW, Rodrigues AD: Cytochrome P450 reaction-phenotyping: an industrial perspective. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3(5): 667-687, 2007.
259. Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP: Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr Med Chem* 16(27): 3480-3675, 2009a.
260. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B: Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 41(2): 89-295, 2009b.
261. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clin Pharmacol Ther* 102(4): 688-700, 2017.
262. Zhou ZW, Chen XW, Sneed KB, Yang YX, Zhang X, He ZX, Chow K, Yang T, Duan W, Zhou SF: Clinical association between pharmacogenomics and adverse drug reactions. *Drugs* 75(6): 589-631, 2015.
263. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P: Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism, *J Cell Mol Med* 6: 189-198, 2002.

## 12. FÜGGELÉK

## 12.1 A gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP enzimek jelentősebb genetikai polimorfizmusai

CYP allél	Meghatározó mutáció <sup>a</sup>	SNP helye, fehérje szintű hatás	Expresszió és/vagy aktivitás változás	Allél-gyakoriság az etnikai populációkban (%) <sup>b</sup>		
				Kaukázusi	Ázsiai	Afrikai Afro-amerikai
<i>CYP1A2*1C</i>	-3860G>A (rs2069514)	promóter	↓expresszió és aktivitás	0,4 - 4	21 - 27	26 - 40
<i>CYP1A2*1D</i>	-2467delT (rs35694136)	promóter	↓aktivitás	3,4 - 11		
<i>CYP1A2*1E</i>	-739T>G (rs2069526)	Intron 1		0,4 - 6		
<i>CYP1A2*1F</i>	-163C>A (rs762551)	Intron 1	↑expresszió és aktivitás; fokozott indukálhatóság	32 - 57		
<i>CYP1A2*1K</i>	-739T>G (rs2069526); -729C>T (rs12720461); -163C>A (rs762551)	Intron 1 SNP-k	↓aktivitás	0,3 – 0,5		
<i>CYP1A2*1L</i>	-3860G>A (rs2069514); -2467delT (rs35694136); -163C>A (rs762551)	promóter SNP-k; Intron 1		0,8		
<i>CYP1A2*1M</i>	-163C>A (rs762551); 2159G>A (rs2472304)	Intron 1; Intron 4		54,8		
<i>CYP1A2*1V</i>	-2467delT (rs35694136); -163C>A (rs762551)	promóter; Intron 1		2,8 – 12,3		
<i>CYP1A2*1W</i>	-2467delT (rs35694136); -739T>G (rs2069526); -163C>A (rs762551)	promóter SNP; Intron 1 SNP-k		1,2 – 2,1		
<i>CYP2B6*4</i>	18053A>G (rs2279343)	K262R	↑aktivitás	2,2 – 6,2	5 - 12	0
<i>CYP2B6*5</i>	25505C>T (rs3211371)	R487C	nincs változás	9 – 12,2	1 - 4	1 - 4
<i>CYP2B6*6</i>	15631G>T (rs3745274); 18053A>G (rs2279343)	Q172H; K262R	↓aktivitás	7 – 28,2	10 - 21	33 - 50
<i>CYP2B6*9</i>	15631G>T (rs3745274)	Q172H	↓aktivitás	0 – 1,5	3,4 – 5,9	4,7
<i>CYP2B6*22</i>	-82T>C (rs34223104)	promóter	↑expresszió	1,4 – 2,4	0 – 2,5	0 – 3,1



<i>CYP2C8*3</i>	2130G>A (rs11572080); 30411A>G (rs10509681)	R139K; K399R	↓aktivitás (paklitaxel)	6,5 - 14	0	0
<i>CYP2C8*4</i>	11041C>G (rs1058930)	I264M	↓aktivitás (paklitaxel)	3 - 7	0 - 1	0 - 1
<i>CYP2C9*2</i>	3608C>T (rs1799853)	R144C	↓aktivitás; NADPH-citokró P450-reduktázzal való kapcsolat sérül	8 - 19	0 – 10,7	0 – 2,3
<i>CYP2C9*3</i>	42614A>C (rs1057910)	I359L	↓↓aktivitás	3 - 16	2 – 10,1	0 – 1,2
<i>CYP2C19*2</i>	19154G>A (rs4244285)	„splicing” hiba <sup>c</sup>	nincs aktivitás	6 - 18	22 - 34	10 – 18,3
<i>CYP2C19*3</i>	17948G>A (rs4986893)	W212X	nincs aktivitás korai stop kodon miatt	0 - 1	1 – 8,3	0 - 1
<i>CYP2C19*4</i>	1A>G (rs28399504)	M1V	nincs aktivitás hibás kezdő kodon miatt	0 - 1	0 – 0,26	0
<i>CYP2C19*17</i>	-806C>T (rs12248560)	promóter	↑expresszió	20 - 25	0 – 2	15 - 27
<i>CYP2D6*3</i>	2550delA (rs35742686)	R259 „frameshift” <sup>c</sup>	nincs aktivitás „frameshift” mutáció miatt	1 – 2	0,001 - 1	0,03 - 1
<i>CYP2D6*4</i>	100C>T (rs1065852); 1847G>A (rs3892097)	P34S; „splicing” hiba	nincs aktivitás	15 - 25	0,6 - 10	1 - 10
<i>CYP2D6*5</i>	teljes gén deléció	enzim-hiány	nincs aktivitás enzim-hiány miatt	2,8 - 4	4,6 - 6	4 – 5,4
<i>CYP2D6*6</i>	1708delT (rs5030655)	W152 „frameshift”	nincs aktivitás „frameshift” mutáció miatt	1 – 1,1	0 – 0,02	0 – 0,3
<i>CYP2D6*10</i>	100C>T (rs1065852)	P34S	↓aktivitás	1 - 2	40 - 70	3,8 - 12
<i>CYP2D6*41</i>	2989G>A (rs28371725)	„splicing” hiba	↓aktivitás	7 - 10	1 - 6	1 - 6
<i>CYP2D6xN</i>	gén-duplikáció/multiplikáció	↑transzkripció	↑expresszió és aktivitás	1 - 9	0 - 2	2 - 30
<i>CYP3A4*1B</i>	-392A>G (rs2740574)	promóter	↑expresszió?	2 - 9	0 – 0,4	35 - 76
<i>CYP3A4*22</i>	15389C>T (rs35599367)	Intron 6	↓ expresszió és aktivitás	2,5 - 8	4,3	4,3
<i>CYP3A5*3</i>	6986A>G (rs776746)	„splicing” hiba	nincs aktivitás	88 - 97	66 - 75	12 - 35

<sup>a</sup> az rs szám zárójelben

<sup>b</sup> Chevalier 2001; Ingelman-Sundberg 2005; Ghotbi 2007; Djordjevic 2010; Perera 2012; Zanger 2013; Fricke-Galindo 2016; Zhou 2017;  
PharmVar (<https://www.pharmvar.org>)

<sup>c</sup> „splicing” hiba: mRNS érési hiba (kivágódási hiba); „frameshift”: kereteltolódás (genetikai kód eltolódása)

## 12.2 Farmakokinetikai paraméterek becslése

A primer hepatocitákban az „intrinsic clearance” ( $Cl_{int}$ ) értéket a hatóanyag koncentráció csökkenéséből kalkuláltuk:

$$Cl_{int} = \frac{D}{AUC}$$

ahol a  $D$  a dózis (a kiindulási hatóanyag mennyiség: 1 nmól 1 ml-ben) és a koncentráció-idő görbe alatti terület (AUC, „area under curve”):

$$AUC = \frac{B}{\beta}$$

A 0 időpontban az anyag koncentrációja ( $B$ ) 1  $\mu\text{M}$  volt, a  $\beta$ -t a különböző időpontokban mért hatóanyag koncentráció pontokra illesztett görbéből meghatározott felezési idő ( $t_{1/2}$ ) alapján kalkuláltuk. Mivel a  $D$  az *in vitro* rendszerben számadat szintjén azonos a  $B$ -vel, a  $Cl_{int}$  számadat szinten azonos a  $\beta$ -val májsejt koncentrációra vonatkoztatva (Obach 1999):

$$Cl_{int} = \beta = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

A  $Cl_{int}$  májra és testtömegre vonatkoztatott értékét [ $Cl_{int}$  per teljes máj tömeg (g)/ testtömeg (kg)] a 9. táblázatban található paraméterek alapján számítottuk (Sohlenius-Sternbeck 2006; Davies 1993). A máj „clearance” ( $Cl_H$ )-t az alábbiak szerint becsültük (Chiba 2009):

$$Cl_H = \frac{Cl_{int\ máj/bw} * fu * Q_{plazma}}{(Cl_{int\ máj/bw} * fu) + Q_{plazma}}$$

$$Q_{plazma} = Q_H * plazma/vér\ arány$$

A  $Cl_H$  becsléshez a plazma/vér arányt, a máj átáramlást ( $Q_H$ ) (9. táblázat) és a hatóanyag fehérjéhez nem-kötött frakcióját ( $fu$ ) használtuk. A fehérjéhez nem-kötött frakció ( $fu$ ) a sejt-mentes és az inaktivált sejteket tartalmazó inkubátumok centrifugálás utáni felülúszójának hatóanyag koncentrációjából számítható. A máj extrakciós hatásfokát ( $E$ ) és a biohasznosulást ( $F$ ) az alábbiak szerint becsültük:

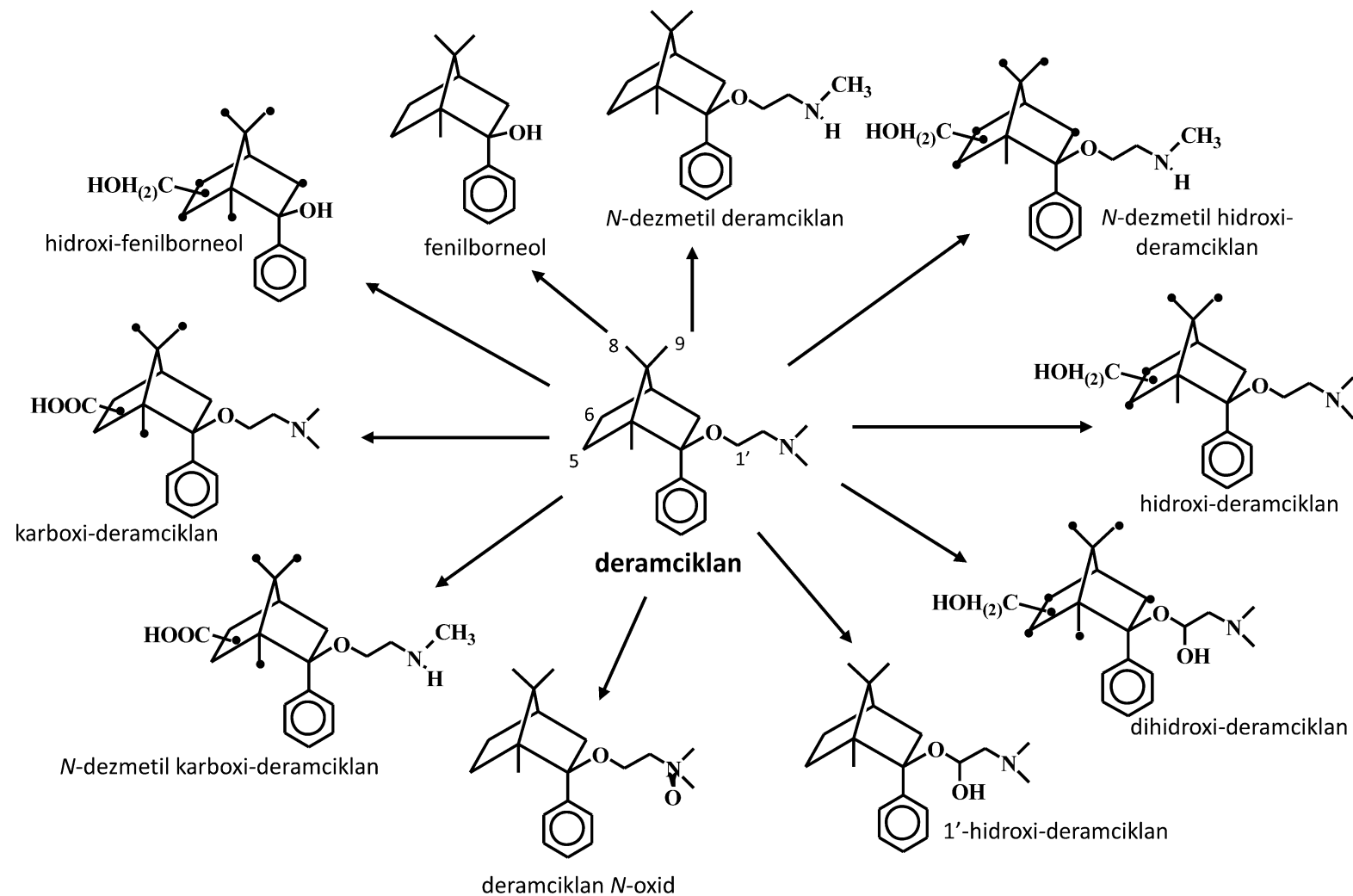
$$E = Cl_H / Q_H$$

$$F = (1 - E) * 100$$

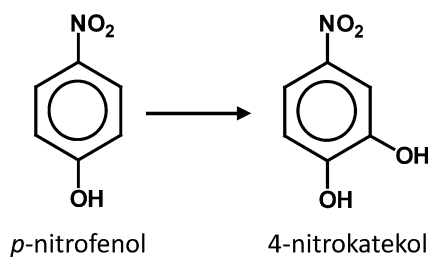
9. táblázat: A farmakokinetikai becsléshez felhasznált paraméterek

	Patkány	Egér	Kutya	Nyúl	Ember
Hepatocita koncentráció a májban (sejt/ g máj)	117*10 <sup>6</sup>	135*10 <sup>6</sup>	215*10 <sup>6</sup>	114*10 <sup>6</sup>	139*10 <sup>6</sup>
Máj tömeg/testtömeg (g/kg)	40	76	32	30,8	23,7
Máj átáramlás ( $Q_H$ ) (ml/perc/kg)	55,2	90	30,9	70,8	19
Plazma/vér arány	0,58	0,59	0,57	0,67	0,57

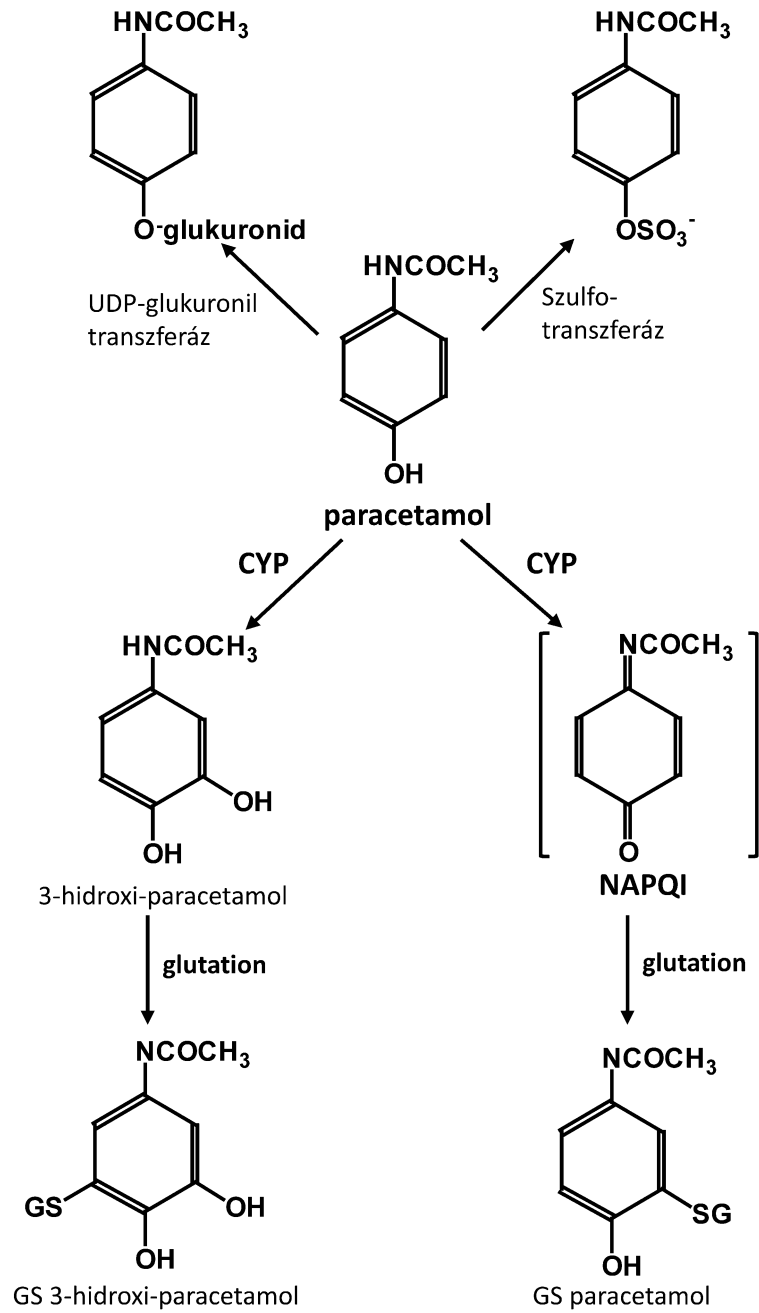
### 12.3 Az EGIS Gyógyszergyár által fejlesztett anxiolitikum, a deramciklan Fázis I. metabolikus útvonalai (S20)



- a szén-atom pozícióját jelzi, ahol a metabolikus átalakulás történhetett

12.4 A *p*-nitrofenol hidroxiláz és a 7-metoxi-4-trifluormetil-kumarin *O*-demetiláz reakció

12.5 A paracetamol metabolizmusa



NAPQI *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin

(S24)

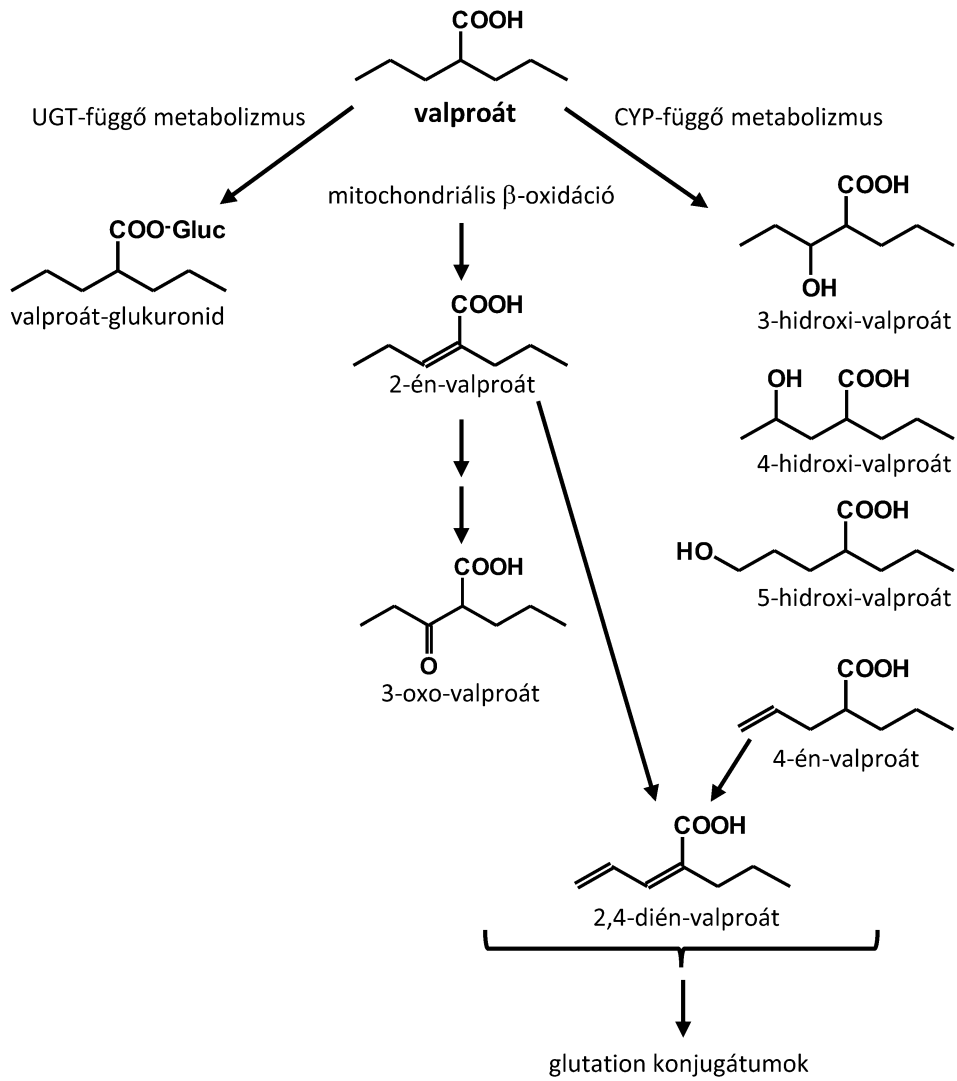
**12.6 A CYP genotípus alapján becsült fenotípus (CPIC ajánlásai alapján)**

(a vizsgálatainkban azonosított CYP genotípusok értékelése)

CYP gén	Gyenge metabolizáló	Intermediér metabolizáló	Normál metabolizáló	Gyors/Ultra-gyors metabolizáló
<i>CYP1A2</i>	Nincs ajánlás			
<i>CYP2B6</i>	*6/*6 *6/*9	*1/*6 *1/*9 *5/*6 *4/*6	*1/*1 *1/*5	*1/*4 *1/*22 *4/*5
<i>CYP2C9</i>	*2/*2 *2/*3 *3/*3	*1/*2 *1/*3	*1/*1	
<i>CYP2C19</i>	*2/*2 *2/*3 *3/*3	*1/*2 *1/*3 *2/*17	*1/*1	*1/*17 *17/*17
<i>CYP2D6</i>	*3/*4(xN) <sup>a</sup> *4/*4(xN) *4(xN)/*5 *4(xN)/*6(xN)	*1/*3(xN) *1/*4(xN) *1/*5 *1/*6(xN) *4(xN)/*10(xN) *4(xN)/*41(xN) *6(xN)/*41(xN)	*1/*1 *1/*10(xN) *1/*41(xN) *1x2 <sup>b</sup> /*4(xN) *1x2/*6(xN)	*1/*1xN <sup>c</sup> *1xN/*10(xN) *1xN/*41(xN)
<i>CYP3A4</i>	Nincs ajánlás			
<i>CYP3A5</i>	*3/*3	*1/*3	*1/*1	

<sup>a</sup>(xN) egy vagy több kópiában előforduló allélvariáns; <sup>b</sup>x2 két kópiában előforduló allélvariáns; <sup>c</sup>xN kettő vagy több kópiában előforduló allélvariáns

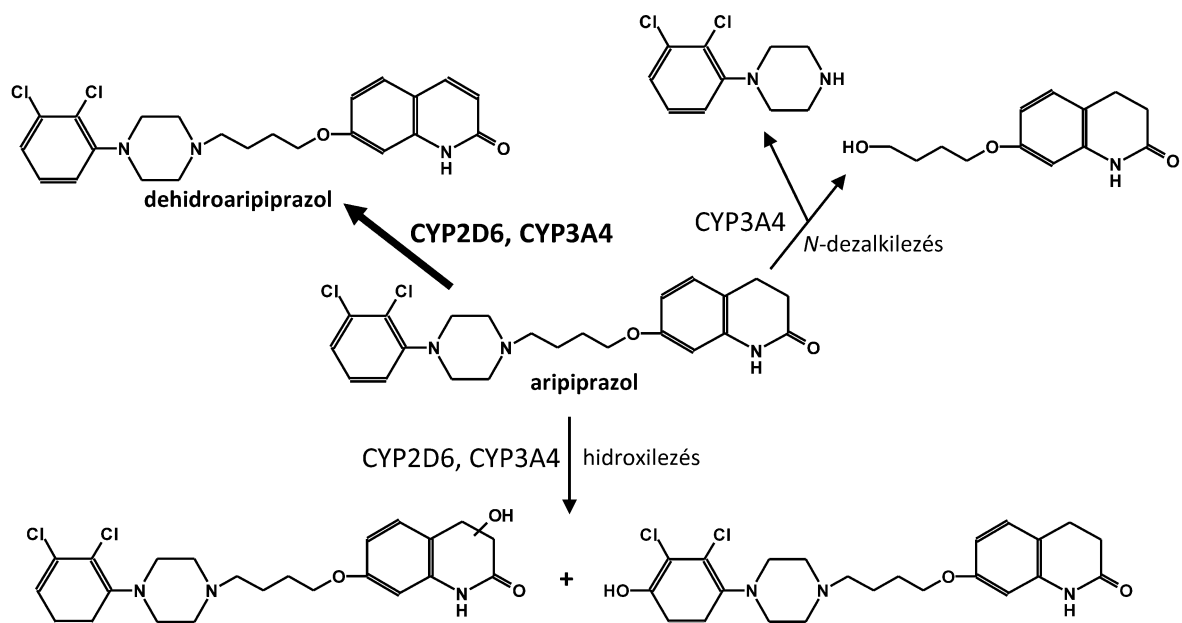
12.7 A valproát metabolizmusa



UGT UDP-glukuronil transzferáz

(Ghodke-Puranik 2013)

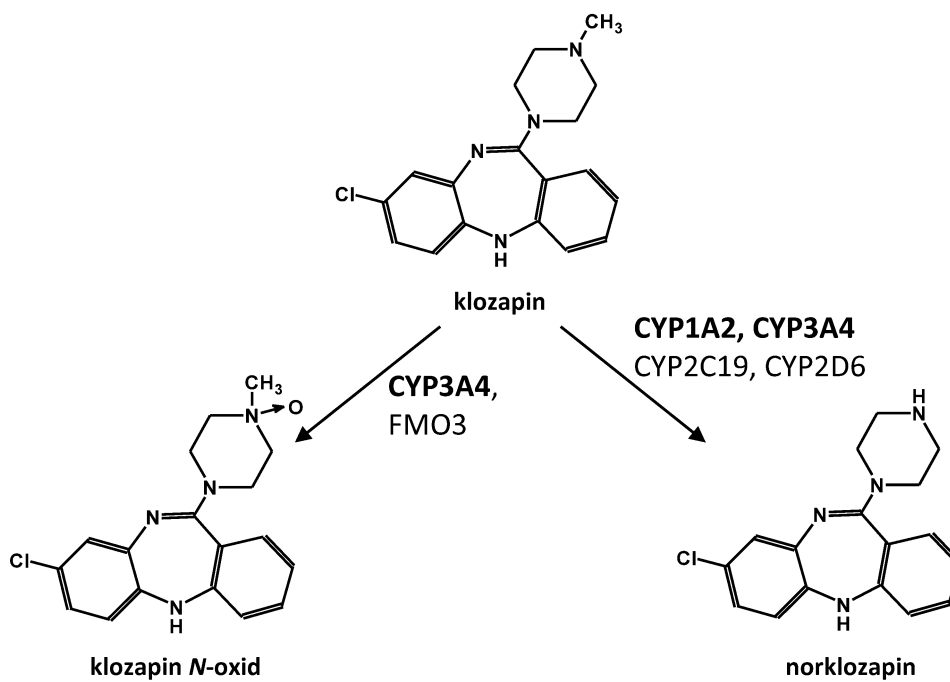
### 12.8 Az aripiprazol metabolizmusa



(Kirschbaum 2008)



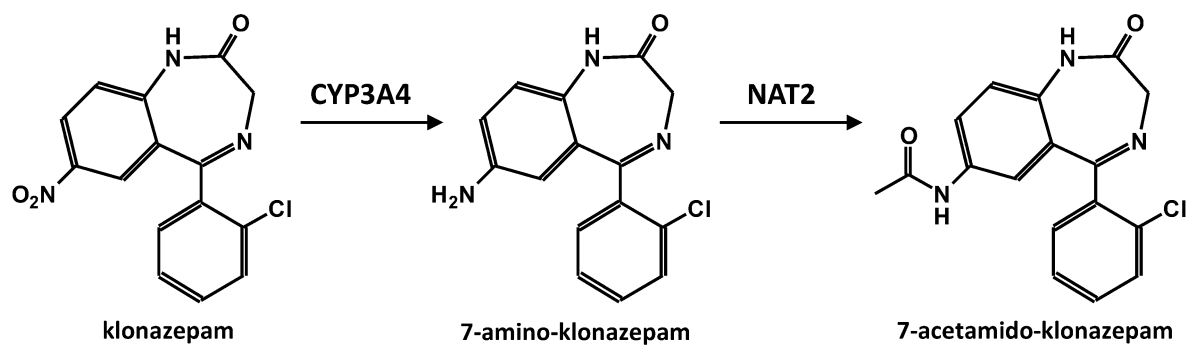
## 12.9 A klozapin metabolizmusa



FMO3 flavin monooxygenáz 3

(Fang 1998)

### 12.10 A klonazepam metabolizmusa



NAT2 *N*-acetyl-transzferáz 2

(Olivera 2007)