

Válaszok Dr Szökő Éva bírálataira

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Professzor Asszonynak, hogy elvállalta a MTA doktori értekezésem bírálatát, köszönöm az értékes idejét, amit a dolgozat alapos átnézésére szánt, a pozitív és támogató véleményét, valamint a gondolatébresztő megjegyzéseit és észrevételeit.

Négy pontban megfogalmazott kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

1. A farmakokinetikai tulajdonságok és gyógyszermetabolizmus *in vitro* becslésére végzett vizsgálatok CYP szelektív gátlók és szubsztrátok alkalmazásával történik. Ahogy saját eredményei alapján is bemutatja, nem helytálló minden esetben az alkalmazott próba-szubsztrát feltételezett szelektivitása. Ez felveti azt a kérdést, hogy egy adott CYP gátló alacsony specificitása eredményezhette-e a próba-szubsztrát szelektivitásának korábbi helytelen értelmezését. Az enzimtérfékezésnél figyelembe veszik-e és hogyan, ha az alkalmazott CYP gátló specificitása mérsékelt? Van-e a gyógyszerengedélyező hatóságok által elfogadott/ajánlott listája a preklinikai vizsgálatokban alkalmazható specifikus CYP gátlóknak és szubsztrátoknak?

A CYP enzimekkel kapcsolatos vizsgálatok kezdetén úgy tartották, hogy két citokróm P450 enzim létezik, amelyek spektrálisan jól megkülönböztethetők a redukált enzim CO-dal képzett abszorpciós maximuma alapján, így P450 és P448 enzimnek nevezték. Ma már több ezer CYP enzimről tudunk az élővilágban; emberben 57 CYP gént azonosítottak, azonban a xenobiotikumok metabolizmusát érdemben alig egy tucat CYP enzim katalizálja. Az egyes enzimek megkülönböztetése, mennyiségük és aktivitásuk meghatározása régi törekvés (az első publikációk az 1970-es évekre nyúlnak vissza), számos CYP-szelektív szubsztrátot, illetve enzimreakciót sikerült azonosítani. A cél, hogy egyszerűen, gyorsan és szelektíven tudjuk meghatározni az egyes enzimek aktivitását.

Mivel a CYP enzimek szubsztrát-specificitása átfedő, a CYP szubsztrátok és gátlók CYP izoenzim szelektivitását és korlátait nagyon fontos feltérképezni, különösen a heterogén biológiai rendszerekben való alkalmazáskor, mint a májsejtek vagy a máj mikroszóma frakció, ahol a preparátum több CYP enzimet is tartalmaz. Az eleinte alkalmazott CYP-szubsztrátokkal egyszerű fotometriás vagy fluoreszcencia mérésen alapuló reakciókban határozták meg a CYP enzimek aktivitását. Ahogy gyarapodott a tudás, be kellett látni, hogy több CYP enzim létezik az endoplazmás retikulum membránjában, mint gondoltuk, ezért körültekintően kell eljárni a szubsztrát vagy a gátló szelektivitás megállapításakor. A szubsztrát koncentrációja nagyban befolyásolhatja, hogy egy vagy több CYP enzim katalizálja az adott reakciót és ugyanígy a CYP gátlók szelektivitása is behatárolható koncentráció-tartományban érvényes. Továbbá a tesztrendszer, amiben vizsgáljuk a szubsztrátokat, gátlókat, szintén körültekintő választást és több oldalról történő megerősítést igényel. Gondolok itt például az ismert CYP-szelektív reakciókkal való korrelációs vizsgálatokra több egyénből származó mikroszóma preparátumon, vagy a CYP izoenzim ellen termeltetett ellenanyaggal való gátlhatóság igazolására.

Professzor Asszony által felvetett kérdések is rávilágítanak arra, hogy mennyire lényeges ismernünk egy szubsztrát vagy gátló CYP szelektivitását. A *p*-nitrofenol hidroxilezés CYP2E1 szelektivitását, valamint a 7-metoxi-4-trifluorometilkumarin *O*-demetiláz reakció CYP2C9 szelektív voltát saját vizsgálataink alapján megkérdőjeleztük. Az alacsony gátló szelektivitásra talán a legjobb példa a cimetidin, amelyről évtizedeken át tartotta magát az a

megállapítás, hogy szelektíven gátolja a CYP3A4 enzim aktivitását. Még 2023-ban is jelent meg közlemény (Pino MA, Azer SA: Cimetidine, 2023 PMID: 31334975, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544255/>), amely a cimetidin klinikailag releváns CYP3A4 gátlását említi, majd példaként számos CYP2C9 és CYP2D6 szubsztrát hatóanyagot sorol fel (warfarin, metoprolol, propranolol, szulfonilurea vegyületek), amelyeknek csökken a „clearance”-e cimetidinnel párhuzamosan történő adagolásakor. Ma már tudjuk, hogy a cimetidin a CYP3A4 aktivitást csak elhanyagolható mértékben, míg sokkal inkább a CYP2C enzimek, így a CYP2C9 és CYP2C19, valamint a CYP2D6 működését gátolja.

Az új gyógyszerjelöltek metabolizmusát katalizáló CYP enzimek azonosításakor, az ún. enzim-térképezés során erős CYP-szelektív gátlószereket alkalmazunk, amelyek gátló hatását magunk is igazoltuk korábban humán máj mikroszóma preparátumokon CYP-szelektív próba reakciókban. Ugyanakkor az FDA, az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyezési Hivatal (US Food & Drug Administration) és az EMA, az Európai Gyógyszer Ügynökség (European Medicines Agency) ajánlásokat fogalmazott meg CYP-szelektív gátlószerekkel és szubsztrátokkal kapcsolatban, amelyek segítséget nyújtanak a gyógyszer-fejlesztésben részt vevő szakemberek számára (1. és 2. táblázat) A táblázatokban vastagítva jelöltem azokat a gátlószereket és CYP-szelektív enzimreakciókat, amelyeket a kutatócsoportban magunk is alkalmazunk.

1. táblázat: *In vitro* alkalmazható CYP-szelektív gátlószerek az FDA ajánlása alapján*

CYP enzim	Gátlószer
CYP1A2	α-naftoflavon , furafillin
CYP2B6	klopidogrel, szertralin, tioTEPA , tiklopidin
CYP2C8	gemfibrozil glukuronid, montelukaszt, fenelzin
CYP2C9	szulfafenazol , tienilsav
CYP2C19	<i>N</i> -3-benzil-nirvanol, loratadin, nootkaton, tiklopidin
CYP2D6	paroxetin, kinidin
CYP3A4/5	azamulin, itrakonazol, ketokonazol , troleandomicin , verapamil

*<https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers#table1-2>

2. táblázat: *In vitro* alkalmazható CYP marker reakciók az FDA ajánlása alapján*

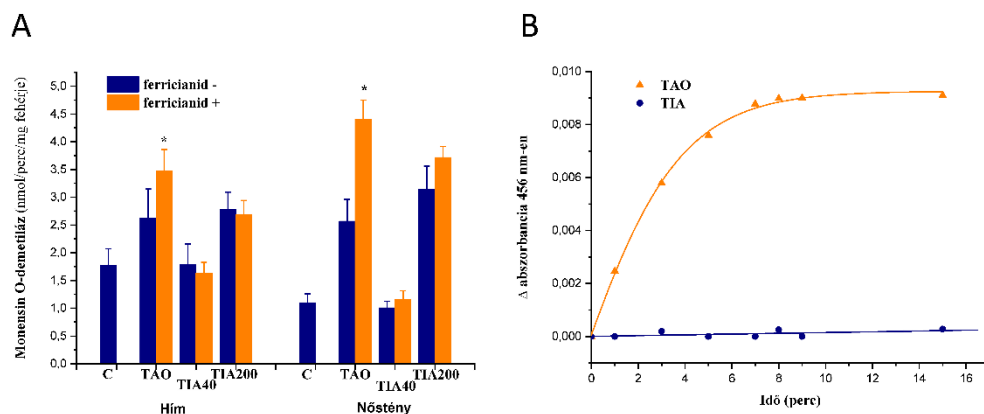
CYP enzim	CYP-szelektív enzimreakció
CYP1A2	7-etoxiresorufin-<i>O</i>-deetiláz , fenacetin <i>O</i>-deetiláz
CYP2B6	bupropion hidroxiláz, efavirenz hidroxiláz
CYP2C8	amodiakvin <i>N</i> -deetiláz, paklitaxel 6 α -hidroxiláz
CYP2C9	diklofenak 4'-hidroxiláz, <i>S</i> -warfarin 7-hidroxiláz
CYP2C19	<i>S</i>-mefenitoin 4'-hidroxiláz
CYP2D6	bufuralol 1'-hidroxiláz, dextrometorfan <i>O</i>-demetiláz
CYP3A4/5	midazolam 1'-hidroxiláz , tesztoszteron 6 β -hidroxiláz

*<https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers#table1-2>

2. A tiamulin monensin kölcsönhatás vizsgálata meglepő eredményt hozott, hisz a tiamulin CYP3A4 indukáló és gátló hatását is tapasztalták az in vivo és in vitro vizsgálataikban. Arra a következtetésre jutottak, hogy a monensinnel való együttes alkalmazásakor a gátló hatás jut érvényre (a monensin toxicitása nő), de ennek nem adták egyértelmű magyarázatát. Vizsgálták annak lehetőségét, hogy a tiamulinból képződhet enzimgátló hatású metabolit?

A tiamulin-monensin kölcsönhatás hátterének feltárásakor azt feltételeztük, hogy a tiamulin valószínűleg gátolja a monensin metabolizmusát katalizáló CYP enzime(ke)t. Patkány máj mikroszómán igazoltuk is, hogy a tiamulin blokkolta a monensin metabolizmusának első lépését, a demetilézést. Ráadásul indukálta a patkány CYP3A enzimek expresszióját és aktivitását, amely együtt járt a monensin *O*-demetiláz aktivitás 1,5-2,8-szeres emelkedésével. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a CYP3A indukcióhoz köthető monensin *O*-demetiláz aktivitás növekedés csak magas 200 mg/kg tiamulin dózis mellett jelentkezett, a 40 mg/kg dózis azonban nem vezetett aktivitás emelkedéshez. Az állatorvosi gyakorlatban a tiamulint baromfiaknál és sertéseknél alkalmazzák antibiotikumként 3-5 napig tartó kezelések során, a napi dózis 30-50 mg/testtömeg kg baromfiaknál, míg 4-25 mg/kg sertéseknél. A patkányoknál alkalmazott alacsony, 40 mg/kg napi dózis 5 napon keresztül feleltethető meg az állatgyógyászati gyakorlatnak, míg ennek 5-szöröse a gyakorlatban nem elképzelhető. Ezért az enzimműködés közvetlen gátlásának nagyobb szerepet tulajdonítottunk a tiamulin-monensin kölcsönhatásban és a toxikus tünetek kialakulásában, mint a magas dózissal bekövetkező CYP3A indukciónak.

A tiamulin metabolizmusát ugyan nem vizsgáltuk, de felmerült, hogy hasonlóan a troleandomicinhez, a tiamulinból is képződhet olyan metabolit, amely metabolikus intermedier komplexet képezve irreverzibilisen gátolja a CYP enzimaktivitást. Az irreverzibilis gátlás a klinikai gyakorlatban súlyosabb megítélés alá esik, mint a reverzibilis gátlás, hiszen az enzim *de novo* szintézise szükséges ahhoz, hogy helyreálljon a normál enzimaktivitás. Ennek lehetőségét azonban kizártuk a tiamulinnal kapcsolatban, ugyanis szemben a troleandomicinnel, a tiamulinnal kezelt állatok májmikroszómájában az enzimaktivitás nem változott a ferricianiddal való kezelést követően – a ferricianid felszabadítja az enzimet a metabolikus intermedier komplexből (1.A ábra).



1. ábra: A metabolikus intermedier komplex megszüntetésének hatása a monensin *O*-demetiláz aktivitásra (A), valamint a troleandomicin, illetve a tiamulin metabolikus intermedier komplex képződése patkány máj mikroszómában (B). TAO troleandomicin, TIA tiamulin, *P<0,05

Továbbá a tiamulint patkány máj mikroszómával közvetlenül inkubálva nem figyeltünk meg MI-komplex kialakulására jellemző spektrális változást még 30 perc után sem, míg troleandomicinnel történő inkubálás már néhány (4-5) perc elteltével jelentős változást eredményezett (1.B ábra), ami a troleandomicin koncentrációjának növelésével fokozódott.

3. Vizsgálták a metabolizáló enzimek aktivitását befolyásoló nem-genetikai tényezőket, melyek között különbséget tettek a CYP szelektív és nem CYP szelektívek között. Nem világos, hogy pontosan min alapul a megkülönböztetés. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció mi alapján került a nem CYP szelektív befolyásoló faktorok közé (a vizsgált izoenzimek közül csupán kettő esetében csökkentette az expressziót).

CYP-szelektív fenokonverziós tényezőnek tekintettük 1) a CYP indukcióhoz és 2) a CYP enzimaktivitás gátlásához vezető hatásokat. A CYP indukció általában xenobiotikumok (gyógyszerhatóanyagok, táplálékkomponensek, környezeti kemikálák) hatására következik be, amely az esetek többségében receptor-mediált folyamat és a CYP gén transzkripció, valamint az enzimaktivitás fokozódásához vezet. Másrészt a CYP enzimaktivitást a gyógyszerhatóanyagok közvetlenül kötődve az enzimfehérjéhez gátolhatják, amely az aktivitás csökkenésével jár.

Nem CYP-szelektív tényezőnek tekintettük azokat az anyagokat (amoxicillin+klavulánsav, krónikus alkohol bevitel a májszövet donor klinikai történetében az agyhalál beálltakor), amelyek nem közvetlenül a CYP génekre vagy az enzimfehérjére fejtik ki hatásukat, hanem például a máj károsodását idézhetik elő. Az amoxicillin és a klavulánsav közvetlen CYP enzimaktivitást befolyásoló hatását humán máj mikroszóma preparátumon korábban jómagam is vizsgáltam, azonban semmilyen aktivitás csökkenést nem sikerült elérni sem külön-külön, sem kombinációban alkalmazva a két hatóanyagot (nem publikált eredmény). A májkárosító faktorok nem kizárólag a CYP enzimek vagy egyes CYP izoenzimek expresszióját, aktivitását befolyásolják, hanem általánosan a máj állapotának megváltozásával számos patofiziológiai folyamatot indítanak el, amely többek között beszűkült májfunkcióhoz, így csökkent gyógyszermetabolizmushoz vezethet. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció okozta májkárosodás patomechanizmusa máig feltáratlan, egyelőre nincs magyarázat a toxicitás késleltetett megjelenésére (a latencia idő átlagosan 20-30 nap), sem az egyéni érzékenységre (tünetmentes állapot, enyhe májfunkció romlás vagy akut májelégtelenség is előfordulhat). A krónikus alkohol bevitel okozta patofiziológiai folyamatok jól ismertek, azonban semmiképp sem tekinthetők CYP-specifikus hatásoknak. Az értekezésben a humán máj mikroszóma panel CYP aktivitásait bemutató 17. ábrán az amoxicillin+klavulánsav kezelés jellemzően gyenge vagy intermedier metabolizáló fenotípushoz kapcsolódott függetlenül attól, hogy melyik CYP aktivitást tekintettük. A multivariancia analízisen kívül a nem CYP-specifikus faktorok előfordulási gyakoriságát is vizsgáltuk a gyenge/intermedier és a normál/ultra-gyors metabolizáló fenotípusú májszövet mintáknál, utólagosan az amoxicillin+klavulánsav kezelésre külön is elvégeztem a statisztikai értékelést Fisher teszttel (3. táblázat), amely megerősítette, hogy az amoxicillin+klavulánsav kezelés inkább a gyenge és intermedier CYP fenotípusú májszövet minták háttér információi között fordult elő és csak elvéve a normál és ultragyors metabolizálóknál. Meg kell jegyezni, hogy a CYP2D6-nál a szignifikáns eltérés kritériuma a $P < 0,05$ nem teljesült az alacsony amoxicillin+klavulánsav előfordulás miatt.

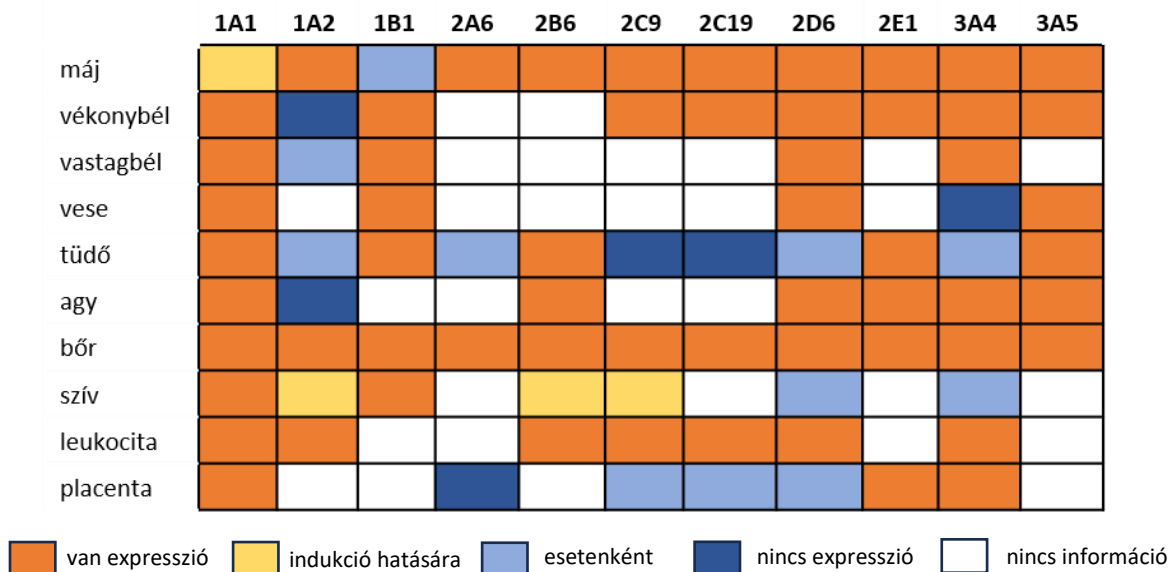
3. táblázat: A CYP aktivitást befolyásoló amoxicillin+klavulánsav kezelés előfordulási gyakorisága májszövet donoroknál

CYP aktivitás	PM-IM vagy PM-alacsony IM*	EM-UM vagy magas IM-EM*	P (Fisher teszt)
CYP1A2	7/73	0/68	0,0138
CYP2B6	8/53	1/52	0,0313
CYP2C9	6/75	0/70	0,0286
CYP2C19	8/69	1/68	0,0331
CYP2D6	4/67	0/65	0,1195

*PM gyenge, IM intermedier, EM normál, UM ultragyors metabolizáló fenotípus

4. Nagyon érdekes az egyes CYP enzimek aktivitása és a leukocytákban mérhető mRNS expressziójuk összefüggésének vizsgálata. Négy izoenzim (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4) esetében találtak jó korrelációt, ha a korrelációs analízisből kizárták a genotípus alapján gyenge metabolizálónak minősített betegeket. Mi állhat a CYP2D6 esetében a májszövet és a leukocyta CYP izoenzim mRNS expressziója közötti eltérés hátterében? A leukocyta CYP mRNS expresszió változásában mely fenokonverziót eredményező faktorok hatása jelenhet meg? Számos előnye mellett mennyire okozhat problémát, hogy az enzimgátló hatás jelenlétét feltehetőleg nem jelzi?

A CYP enzimek eltérő szöveti megjelenéséről bőszeges irodalmi adattal rendelkezünk, egy áttekintő ábrán foglaltam össze az ismereteket (2. ábra).



2. ábra: A xenobiotikumok metabolizmusát katalizáló leglényegesebb CYP enzimek szöveti expressziója (Raunio 1999; Hukkanen 2002, Baron 2008, Shimada 1996, Guengerich 2015, He 2015)

A CYP2D6 gén transzkripcióját, ellentétben más, a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimmal, kémiai anyagok nem befolyásolják, azaz a jelenlegi ismereteink szerint gyógyszer vagy egyéb testidegen anyag hatásra a CYP2D6 expresszió nem indukálódik. A CYP2D6 konstitutív expresszióját ugyanakkor számos transzkripciós faktor szabályozza. A máj-specifikus HNF4 α (hepatocita nukleáris faktor 4 α) a CYP2D6 expresszió meghatározó

regulátora a májban, amely azonban hiányzik más szövetekben. A CYP2D6 eltérő kifejeződését figyelték meg az agyban, ahol is a lokális CYP2D6 metabolizmus számos pszichoaktív hatóanyag hatékonyságát módosíthatja (pl. kodein). Hátterében több mechanizmus is állhat, amely egyes transzkripciósi faktorok, nukleáris receptorok eltérő szöveti expressziójára vezethető vissza [pl. cAMP-response element-binding protein 1 (CRE-BP1), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)] (Turman et al. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006, Zhang et al Neurosci 2018). Egy tavaly megjelent közleményben leírták, hogy egereknél az agy Cyp2d aktivitása hormonális hatásra (ösztadiol, progeszteron) megváltozik, és a ciklikusan változó hormonszintek folyamatosan változó Cyp2d metabolizmust eredményeznek (Arguelles et al. Biochem Pharmacol 2022). A leukocitákban tapasztalt eltérő CYP2D6 expressziót is magyarázhatjuk szövetspecifikus regulációval, ahogy azt a hepatikus és az agyi expresszió esetén leírták, azonban a leukocita CYP2D6 expresszió ilyen típusú szabályzására vonatkozó konkrét ismeretet az irodalomban nem találtam.

A CYP fenokonverzióval kapcsolatban meg kell még említeni a megbetegedések, fertőzések, gyulladásal és citokin felszabadulással járó kórképek során jelentkező CYP expresszió változásokat. Számos citokinnról ismert [interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumornekrózis faktor α (TNF α)], hogy csökkenteni nemcsak a CYP enzimek expresszióját, de a transzportereket is (Christensen et al, Front Pharmacol 2012, Stanke-Lebesque et al. Pharmacol Therap 2020). Például HIV-fertőzött betegek CYP2D6 aktivitása 90%-al volt alacsonyabb hasonló korú egészségesekhez képest (Jones et al. Eur J Clin Pharmacol 2010). Daganatos megbetegedések esetén is figyeltek meg CYP aktivitás és expresszió csökkenést (Williams et al. Br J Clin Pharmacol 2000, Helsby et al. Br J Cancer 2008), amelyet többek között citokinek expressziójával magyaráztak (Stipp et al. Cancer Chemother Pharmacol 2021). Az epilepsziás rohamot követően lecsökkenő CYP2C9 expressziót magunk is a felszabaduló IL-1 és IL-6-ra vezettük vissza (Tóth et al. Pers Med 2015). Veseelégtelenségben szenvedő betegeken végzett saját vizsgálataink a CYP expresszió visszaszorulását mutatták ki, amelyet az urémiás toxinok vérben való felszaporodásával magyaráztunk (Déri et al Pharmacol Rep 2020). Ezek a példák azt mutatják, hogy a megbetegedések okozta CYP expresszió változások a genotípus alapján becsülhető gyógyszermetabolizáló képesség átmeneti csökkenését eredményezhetik, amellyel számolni kell és amely a leukocita CYP expresszió alapján becsülhető (kivéve a CYP2D6 és CYP2B6 enzimeket).

Amit viszont nem tudunk becsülni, az a CYP enzimgátló hatás. A perifériás leukocitákból végzett CYPtestTM vizsgálatok során a CYP genetikai polimorfizmusok és a CYP expresszió alapján következtetünk a máj CYP aktivitására. Azonban a CYP enzimfehérje működését közvetlenül befolyásoló gátlószerek hatását a vizsgálat nem jelzi, ami hátránynak tekinthető. Bár az általános CYP genotípus alapú fenotípus becsüléshez képest mindenképp plussz információval szolgál a CYP expresszió meghatározása. Ugyanakkor a gyakorlatban a betegek teljes gyógyszer palettáját áttekintjük és az ismert CYP gátlószerek okozta várható aktivitás csökkenésre felhívjuk a kezelőorvos kollégák figyelmét.



Monostory Katalin