

## Válaszok Dr Melegh Béla bírálatára

Köszönetemet szeretném kifejezni Professzor Úrnak, hogy elfogadta a felkérést és vállalta MTA doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm támogató véleményét, hasznos észrevételeit és a gyakorlati, klinikai alkalmazással kapcsolatos nagyon is fontos kérdéseit.

Köszönöm, hogy felhívta a figyelmemet az ábra számozással kapcsolatos hibára, valamint az egyes ábrákon megjelenő apró karakterek okozta hiányosságra. Ez utóbbit igyekszem korrigálni az előadásomban.

Az értekezéssel kapcsolatban Professzor Úr négy pontban fogalmazta meg kérdéseit.

1. A valproát metabolizmusban szerepet játszó CYP2C9 státusz vizsgálatához nyilvánvalóan rendelkezésre álló genomikai adatokat vette figyelembe. Napjaink genomikai medicinájának az egyik legjelentősebb kritikája az, hogy a minták többségében a fejlett országok lakosságától származó adatokra épülnek, míg jelentős elmaradás mutatkozik akár az afrikai kontinens populációira, nem beszélve az egyéb minoritásokról. Befolyásolhatják-e megfigyeléseit, konklúzióit eddig nem ismert variánsok felismerései? Esetleg adoptálhatóak-e a következtetések ilyen új információ birtokában?

Nagyon köszönöm Professzor Úr kérdését, amelyre először általános választ adnék nemcsak a CYP2C9 enzimre, de a többi a laboratóriumunkban vizsgált enzimre vonatkozóan.

A CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálatok két pillérre épülnek, a *CYP* genotípus megállapítására, valamint a *CYP* expresszió meghatározására (ez utóbbi 4 *CYP* enzimre korlátozva). A *CYP* allélok meghatározásánál 1) egyrészt az enzimaktivitást érdemben befolyásoló polimorfizmusokra, azaz a teljes aktivitás veszteséssel, aktivitás csökkenéssel vagy éppen aktivitás fokozódással járó allélokra, 2) másrészt a Kaukázusi fehér populációban leggyakrabban előforduló allélvariánsokra koncentrálunk. Nagyon lényeges megállapítás, hogy nem fókuszálhatunk kizárólag a Kaukázusi fehér populációban előforduló *CYP* polimorfizmusokra, különösen annak fényében, hogy eltérő előfordulási gyakoriságok ismertek az egyes etnikai populációkban, amely miatt szükségessé válik a fehér populációban ritka allélok azonosítása is. Ezért is bővítjük folyamatosan a meghatározásra kerülő SNP-k, illetve *CYP* allélok körét, továbbá mert az ismeretek bővülésével tisztázódik az egyes allélokhöz köthető aktivitás veszteség vagy fokozódás, ami indokoltá teszi, hogy további allélokat vonjunk be a vizsgálatokba. A CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) adatbázisában szereplő, aktivitásra vonatkozó információk figyelembevételével bővített *CYP* allél paletta képezi a CYPtest vizsgálatok genotípus meghatározási részét.

A *CYP2C9* gén esetében a vad-típusú *CYP2C9\*1* allélon kívül 84 különböző allélt azonosítottak mostanáig, amelyek közül 34-nél igazolódott aktivitás csökkenés vagy teljes funkció kiesés (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>). Az egyes etnikai populációkban való előfordulási gyakorisági adatokkal 8 allélnál rendelkezünk (1. táblázat), közülük a *CYP2C9\*2* és *CYP2C9\*3* allélt azonosítjuk a vizsgálatok során, amelyek a vad-típusú alléllal együtt lefedik a Kaukázusi populáció 99%-át, az ázsiai populáció 89-95%-át és az afrikai, afro-amerikai populáció 90%-át. Ezért valóban indokolt további *CYP2C9* allélok vizsgálata is, és

beemelése a valproát terápia megkezdése előtti CYP2C9-státusz szűrésbe, hiszen az enzimaktivitás csökkenéssel járó CYP2C9 gyenge metabolizálók köre ezzel bővül, és feltehetően ugyanúgy csökkentett valproát dózissigénnyel jár, mint heterozigóta formában a *CYP2C9*\*2, vagy a *CYP2C9*\*3 allél. A homozigóta vad genotípusú (*CYP2C9*\*1/\*1) betegek CYP2C9 expresszió alapján történő kezelésére vonatkozó ajánlás ugyanakkor nem változik.

1. táblázat: *CYP2C9* allélok előfordulási gyakoriságai a CPIC adatbázisa alapján

<i>CYP2C9</i> allél	CYP2C9 aktivitás változás	Allél-gyakoriság az etnikai populációkban (%)		
		Kaukázusi	Ázsiai	Afrikai, afro-amerikai
*1	vad-típus	79	77-91	72-87
*2	↓	<b>12,7</b>	<b>0,2-1,1</b>	<b>1,3-2,2</b>
*3	X	<b>7,6</b>	<b>3,8-11</b>	<b>1,1-1,3</b>
*5	↓	0,02	0	1,0-11,6
*6	X	0,03	0	0,8-0,9
*8	↓	0,18	0,1-0,4	5,9-7,6
*11	↓	0,16	0,03-0,1	1,4-2,6
*12	↓	na	0-0,04	0

na: nincs adat;

A laboratóriumunkban vizsgált *CYP2C9* allélokat vastagítva jelenítettem meg a táblázatban.

2. CYP szelektív gátlás és indukciós hatások vizsgálata során krónikus alkohol fogyasztás és amoxicilin-klavulánsav kezelés befolyásolását figyelték meg számos CYP expressziója és aktivitása vonatkozásában. Megítélése szerint hasonló csökkentő hatás várható-e más esetekben, más exogén behatás esetében, amit érdemes lehet kockázatként figyelembe venni?

CYP fenokonverziót előidéző faktornak tekintettük a krónikus alkoholfogyasztást, amelynek a májat érintő hatásai jól ismertek, illetve az amoxicillin+klavulánsav kezelést. Ezen faktorok nem CYP-specifikusan, egyes CYP enzimek közvetlen gátlásával, vagy az expressziójuk visszaszorításával, hanem májkárosodás és általános májfunkció romlás miatt eredményeznek CYP funkció csökkenését. Hasonló tartós májfunkciót befolyásoló hatást számos egyéb gyógyszer hatóanyagánál is ismerünk, különösen magas dózisban és/vagy tartós adagolás esetén. Csak példaként említeném a daganatterápiában alkalmazott egyes hatóanyagokat (busulfan, ciklofoszfamid, etoposid; Field et al. 2008, Mudd et al. 2021), vagy a nem-szteroid gyulladáscsökkentőket (diklofenak, ibuprofen, Schmeltzer et al. 2016, Zoubek et al. 2020).

További exogén hatásként tekinthetünk a fertőzésekre, például a vírusfertőzésekre, a közvetlenül a májat támadó hepatitis vírusokra, de egyéb vírusokkal, többek között a SARS-CoV-2 koronavírusssal kapcsolatban is leírtak súlyos májkárosodást (Wang et al. 2020, Iheanacho et al. 2022), aminek folyamánya a máj méregtelenítő funkciójának általános romlása. A fertőzések során kialakuló gyulladás vezet elsősorban a CYP enzimek és egyéb, a gyógyszermetabolizmusban szerepet játszó enzimek fenokonverziójához különösen a fertőzés kezdeti időszakában. Bőséges információ van a virális (influenza vírus, HIV, hepatitis A, B, C vírusok, SARS-CoV-2), bakteriális (*Helicobacter pylori*), és parazita fertőzések (malária:

*Plasmodium falciparum*; *Leishmania* sp.) nyomán kialakuló gyógyszermetabolizáló képesség csökkenéséről (Morgan 2017, McElvaney et al. 2020). A gyulladásos válasz során felszabaduló citokinek közül többről is beigazolódott [interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )], hogy visszaszorítja a CYP enzimek expresszióját, sőt úgy tűnik a gyulladással összefüggésbe hozható miRNS-ek (pl. miR-130b) is szerepet játszanak a CYP expresszió csökkenésében (Aitken et al. 2007, Rieger et al. 2015, Lenoir et al. 2021). A CYP expresszió csökkenés kialakulásának hátterében több molekuláris mechanizmust kell említeni: 1) antagonistá hatású faktor [CCAAT-enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) rövid formája] citokin hatásra aktiválódik és blokkolja a CYP gének átíródását, 2) a CYP expressziót pozitívan szabályzó transzkripciós faktorok [hepatocita nukleáris faktor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), C/EBP aktív formája] és nukleáris receptorok [pregnán X receptor (PXR), konstitutív androsztán receptor (CAR)] expressziója csökken citokin hatásra, 3) miRNS hatásra bekövetkező CYP és nukleáris receptor mRNS degradáció (Shah et al. 2015, Morgan 2017).

Ki kell még térni az állandó zsírdús táplálkozás okozta kóros folyamatok hatására. A fokozott zsírbevitel egyrészt elhízáshoz, másrészt az elhízáshoz kapcsolódó patológiás állapotokhoz, pl. inzulin rezisztenciához, zsíryanycsere zavarhoz, magas vérnyomáshoz vezet, amely az NAFLD-nek rövidített nem-alkoholos zsírmáj betegségek kialakulását vetíti előre. A NAFLD betegségspektrumába az egyszerű steatozis (a máj kóros zsírfelhalmozása) és a súlyos nem-alkoholos steatohepatitis is beletartozik. A máj elzsírosodása és a kialakuló patológiai folyamatok több CYP enzim expressziójának és aktivitásának csökkenését idézik elő, például a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 (Fisher et al. 2009, Merrell et al. 2011, Woolsey et al. 2015, Powell 2023). A nem-alkoholos zsírmáj betegségben, főként előrehaladott stádiumban a gyulladásos mediátorok, mint az IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  citokinek felszabadulása megfigyelhető, amelyekről tudjuk, hogy a CYP enzim expressziót negatívan befolyásolják, így nem meglepő, hogy a steatozis, steatohepatitis együtt jár a gyógyszermetabolizáló képesség beszűkülésével.

3. Valproát ismertén hepatotoxikus szer. Véleménye szerint eredményeit befolyásolhatja-e az egyéni máj károsíthatóság mértéke, ami különböző lehet, akár súlyos hiperamonémiával társuló steatózis is?

A CYP2C9-státusz (*CYP2C9* genotípus és CYP2C9 expresszió) és a valproát vérszint, összefüggéseit epilepsziás gyermekeknél vizsgáltuk és tettünk javaslatot a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózusra. Felnőtteknél már elhanyagolható a valproát metabolizmus CYP2C9 útvonala az UDP-glukuronidázok érettsége és a glukuronidációs reakció előtérbe kerülése miatt. Természetesen gyermekeknél is előfordulhatnak olyan, a májat érintő patológiás állapotok, mint az elhízás, vagy egyéb metabolikus betegség talaján kialakuló, az előzőekben érintett zsírmáj kialakulása, vagy a genetikai okokra visszavezethető Wilson kór (rézanyagcsere zavara), amely májkárosodást idéz elő, illetve a Gilbert kór, amely csökkent UDP-glukuronidációt eredményez. Ez utóbbival kapcsolatban említeném, hogy a glukuronidáció kicsi gyermekkorban amúgy is alacsony mértékű, későbbi életkorban fokozatosan emelkedik, azonban előfordul, hogy még 10-15 éves korra sem éri el a felnőttekre jellemző aktivitást (Ginsberg 2002). Ezért is tolódik a valproát metabolizmusa a CYP2C9 útvonal felé.

A Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézet Madarász utcai Kórházában a neurológus kollégák (Dr Nagy Andrea és Dr Szever Zsuzsa főorvosok) mielőtt megkezdénék a kezelést, teljeskörű kivizsgálást végeznek a kisbetegeknél, amelybe a májfunkciót érintő vizsgálatok is beletartoznak. Az alap májfunkció legkisebb kóros eltérése esetén alternatív hatóanyagot választanak (pl. lamotrigin). Továbbá a valproát kezelést nem indítják el addig, amíg a beteg CYP2C9-státuszáról nem adunk információt. Két, CYP2C9 enzimfunkció csökkenéshez vezető allélt hordozó (*CYP2C9\*2/\*2*, *CYP2C9\*3/\*3*, *CYP2C9\*2/\*3*) betegeknél alternatív hatóanyagot választanak, heterozigóta formában hordozó (*CYP2C9\*1/\*2*, *CYP2C9\*1/\*3*) betegeknél a normál dózis felére csökkentett napi valproát adagot javasolunk, míg a funkciót csökkentő *CYP2C9* allélt nem hordozó (*CYP2C9\*1/\*1*) betegeknél a CYP2C9 expresszió mértékéhez igazítjuk a dózis javaslatot. A májfunkció ellenőrzés a valproát kezelés megkezdését követően is rendszeresen megtörténik (ha nem jelentkeznek panaszok a betegnél, 1., 3., 6. hónapban, majd félévente). Így egyfelől a körültekintő, mindenre kiterjedő beteg-kivizsgálás, amelynek kiegészítő eleme a CYP2C9-státusz vizsgálata, valamint a beteg alapállapotához igazított gyógyszerválasztás, másfelől a CYP2C9-státusz alapján megtervezett valproát céldózis és az óvatos dózis felépítés együtt, úgy gondolom, biztonságosabb alkalmazást tesz lehetővé.

4. A szívatültetés életmentő beavatkozás, de nem tekinthető napjaikban sem rutin tevékenységnek. Hogy ítéli meg, munkái részei lehetnek-e egy ajánlandó panelnek, melyek eredménye figyelembe veendő betegágy mellett is?

Az immunszuppressziós terápia beállítása talán az egyik leglényegesebb feladat a szervátültetést követően, ami komoly kihívást jelent különösen a korai posztoperatív időszakban, hiszen meg kell védeni a beültetett szervet a kilökődéstől és minimalizálni kell az immunszuppressziós hatóanyagok okozta mellékhatásokat. Számos transzplantációs centrum szerte a világban már rutinszerűen alkalmazza a *CYP3A5* genotípus meghatározást és ehhez igazítja a takrolimusz adagolását, amelyhez nagy segítséget jelent a CPIC ajánlása (<https://cpicpgx.org/guidelines/guideline-for-tacrolimus-and-cyp3a5>). A várólistán lévő, vese-, szív- és tüdőátültetésre váró betegek *CYP3A5* genotípus szűrése még a transzplantációt megelőzően megtörténhet, így a kezdeti takrolimusz dózis előre megtervezhető. Májtranszplantált betegeknél az előszűrés nem alkalmazható, hiszen a beültetésre kerülő donor májra vonatkozó információra van szükség a takrolimusz dozírozásának megtervezéséhez.

A CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálatok során a CYP3A-státuszt a *CYP3A5* genotípus, valamint a CYP3A4 expresszió meghatározásával állapítjuk meg. Mivel a CYP3A4 expresszió változhat az időben, a CYP3A4 mRNS szint meghatározást mindenképp a transzplantáció időpontjában vett vérmintából szükséges elvégezni és az általános gyakorlatunk az, hogy ugyanebben az időpontban történik a *CYP3A5* genotípus meghatározás is. Napi szinten készenlétben állnak a kutatócsoport tagjai a vérminta fogadására és a CYP3A-státusz meghatározására. Májtranszplantáció esetén a donorszerv beérkezésének pillanatában fogadjuk a vérmintát és mire befejeződik a műtéti beavatkozás, de legkésőbb a rákövetkező napon a beültetett szerv CYP3A-státusza is ismert, ami szerint alakítható a takrolimusz adagolása. Szívtranszplantáció esetén nincs ekkora versenyfutás az idővel, ugyanis a beavatkozást követő antithymocita globulin terápia folytatásaként a 4-5. napon kezdődik csak a takrolimusz kezelés, így elegendő

néhány napon belül információt adnunk. Jelenleg a budapesti centrumoknál (Semmelweis Egyetem) a szándék megvan az alkalmazásra, a finanszírozási lehetőségek szabják meg, hogy igénylik-e a vizsgálatot. A vidéki centrumok közül a Debreceni Egyetem Transzplantációs Tanszékével van élő együttműködésünk.

A takrolimusz terápiára vonatkozó, *CYP3A5* genotípus vizsgálati ajánlás már megszületett a CPIC munkája nyomán. Azonban a *CYP3A5\*1* vad-típusú allél azonosítása az európai fehér populációban csak az esetek kb. 10%-ában jelent segítséget a dózis meghatározásában. A többi, *CYP3A5\*3/\*3* genotípusú betegnél (májtranszplantáció esetén a donor szervnél) szükség van a kiegészítő *CYP3A4* expresszió meghatározásra is. A tapasztalat az, hogy a *CYP3A*-státuszhoz igazított terápia érdemben rövidíti le a kalcineurin inhibitor terápia beállításának idejét, összehasonlítva a vérszint alapú 'titrálásos' klinikai gyakorlattal. Szeretném hangsúlyozni azonban, hogy a vérszint ellenőrzésétől semmiképp nem lehet eltekinteni.

Professzor Úr kérdésére összegezve szeretnék válaszolni, az eredmények úgy látom meggyőzték a transzplantációs szakembereket. Emellett nagyon remélem a transzplantációban részt vevő kollégákkal együtt, hogy a *CYP* vizsgálatok finanszírozását a jövőben a centrumoktól majd átveszi az Egészségbiztosítási Alapkezelő (NEAK), ami sok szempontból kiszámíthatóbbá tenné az alkalmazást.



Monostory Katalin