

**SZEMÉLYRE SZABOTT GYÓGYSZERES TERÁPIA
KIALAKÍTÁSÁHOZ SZÜKSÉGES DIAGNOSZTIKAI ELJÁRÁS
KIDOLGOZÁSA**

Doktori értekezés

Temesvári Manna
okleveles biomérnök

**ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola
Szerkezeti Biokémia Program**

**Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Erdei Anna
Programvezető: Prof. Dr. Gráf László**



**Témavezető: Monostory Katalin Ph.D.
laboratóriumvezető**

**Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont**



Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEJYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS	5
2.1. A XENOBIOTIKUMOK METABOLIZMUSA.....	5
2.2. A CYP ENZIMEK JELLEMZÉSE	6
2.3. A CYP1-3 GÉNCALÁD JELLEMZÉSE	7
2.4. JELENTŐSEBB GENETIKAI VARIÁCIÓK A CYP1-3 GÉNCALÁDDBAN	10
2.4.1. A CYP2C9 enzim és klinikai jelentőséggel bíró génhibái.....	12
2.4.2. A CYP2C19 enzim és a klinikai jelentőséggel bíró génhibái.....	17
2.4.3. A CYP2D6 enzim és klinikai jelentőséggel bíró génhibái.....	20
2.4.4. CYP3A enzimek és a klinikai jelentőséggel bíró génhibáik	25
2.5 A CYP ENZIM AKTIVÍTÁSRA HATÓ EGYÉB, NEM GENETIKAI FAKTOROK JELENTŐSÉGE	26
2.6. A GYÓGYSZER-LEBONTÓ KÉPESSÉG MEGHATÁROZÁSA	31
3. CÉLKITŰZÉSEK	33
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
4.1. A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT VEGYSZEREK, REAGENSEK.....	35
4.2 MÁJSZÖVET, ILLETVE VÉRMENTÁK	35
4.3. A MIKROSZÓMA PREPARÁLÁS MENETE.....	36
4.4. SPECIFIKUS CYP ENZIMAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁS	36
4.5. LEUKOCITA IZOLÁLÁS TELJES VÉRBBŐL.....	40
4.6. DNS IZOLÁLÁS LEUKOCITÁKBÓL	40
4.7. RNS IZOLÁLÁS.....	40
4.8. REVERZ TRANZKRIPCIÓ	41
4.9. PCR (POLIMERÁSE CHAIN REACTION) TAQMAN PRÓBÁKKAL.....	41
4.9.1. CYP mRNS mennyiség meghatározása kvantitatív real-time PCR-el.....	41
4.9.2. SNP (Single Nucleotide Polimorphism) és egy bázis deléció kimutatása hidrolízis SNP analízissel.....	43
4.10. CYP-GENOTÍPIZÁLÁS HRM (HIGH RESOLUTION MELTING CURVE) ANALÍZISSSEL	46
4.11. A PCR TERMÉKEK ELLENŐRZÉSE	46
4.12. STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS.....	47
5. EREDMÉNYEK	48
5.1. CYP ENZIMAKTIVITÁSOKBAN MUTATKOZÓ KÜLÖNBSEGEK	48
5.2. CYP ENZIMEK EXPRESSZIÓJA A MÁJBAN	53
5.3. A MÁJ CYP ENZIM AKTIVITÁSAI ÉS CYP EXPRESSZIÓJA KÖZTI KORRELÁCIÓ.....	54
5.4. CYP ENZIMEK EXPRESSZIÓJA LEUKOCITÁKBAN	60
5.5. KORRELÁCIÓ A CYP ENZIM AKTIVITÁSOK ÉS A LEUKOCITÁKBAN TÖRTÉNŐ CYP EXPRESSZIÓ KÖZÖTT	61
5.6. A GYÓGYSZER-LEBONTÓ KÉPESSÉG MINŐSÍTÉSE: GYENGE, ÁTLAGOS ÉS EXTENZÍV METABOLIZÁLÓ FENOTÍPUSÚ CSOPORTOK ELKÜLÖNÍTÉSE A 'CUT-OFF' ÉRTÉKEK ALAPJÁN	67
5.7. CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ÉS CYP3A5 ALLÉL ÉS GENOTÍPUS GYAKORISÁGOK	68
5.8. A GYENGE, ÁTLAGOS ÉS EXTENZÍV METABOLIZÁLÓ FENOTÍPUS GYAKORISÁGA	71
5.9. CYP2C19*2 GENOTÍPUS MEGHATÁROZÁSA HRM ANALÍZISSSEL	72
5.10. KLINIKAI PÉLDÁK A CYP-STÁTUS ALAPJÁN KIALAKÍTOTT SZEMÉLYRE SZABOTT GYÓGYSZERES KEZELÉSRE (ESETTANULMÁNYOK).....	79
5.10.1. Másfél hónapos újszülött epileptikus tüneteinek sikeres kezelése	80
5.10.2. Takrolimusz dózis beállításának nehézségei egy szívtranszplantált betegnél.....	80
5.10.3. Egy 33 éves nőbeteg alacsony karbamazepin vérszintjének oka	81
5.10.4. Egy 52 éves férfi immunszuppresszív terápiájának módosítása	82
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	84
7. KÖVETKEZTETÉSEK	90
8. TÉZIS PONTOK	92
9. ÖSSZEFOGLALÁS	94
10. SUMMARY	96

11. IRODALOMJEGYZÉK.....	97
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117
MELLÉKLET	119

Rövidítésjegyzék

AhR: aromatic hydrocarbon receptor

ARNT: AhR nuclear translocator

AUC: area under the concentration-time curve

BHQ: black hole quencher

CAR: constitutive androstan receptor

COX2: ciklooxigenáz 2

CYP: citokróm P450

DEPC: dietil pirokarbonát

dNTP: dezoxiribonukleozid-trifoszfát

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

GAPDH: glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GR: glukokortikoid receptor

GRE: glukokortikoid responsive element

HPLC: high performance liquide chromatography

HPLC-MS: HPLC -mass spectrometry

HRM: high resolution melting curve

NADH: α -nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH: α -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

PBS: phosphate buffered saline

RT-PCR: Real-time polimerase chain reaction

PXR: pregnane X receptor

PXRE: PXR responsive element

QD: quartile deviation

RFU: relative fluorescence unit

RXR: retinoid X receptor

SD: standard deviation

SNP: single nucleotide polimorphism

TATA box: cis szabályozó szakasz a promóter régióban, a TATA a nukleotidokat jelenti

TRIS: 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

VDR: D-vitamin receptor

XRE: xenobiotic responsive element

1. Bevezetés

A gyógyszeres terápia során jelentkező nem-kívánt mellékhatások egy része a gyógyszer-metabolizmus eltéréseiből, vagy megváltozásából fakad. A máj gyógyszer-metabolizáló képességét elsősorban a citokróm P450 (CYP) enzimek mennyisége és aktivitása határozza meg, amely nagyban befolyásolhatja egy adott gyógyszer hatékonyságát és esetleges toxicitását. A sejtekben levő CYP enzimszint genetikailag meghatározott, amit külső (gyógyszerek, peszticidek, élelmiszer adalékok, dohányzás, alkoholfogyasztás) és belső tényezők (kor, nem, betegségek, hormonális állapot) módosíthatnak.

A dolgozatban bemutatásra kerül egy többlépcsős diagnosztika eljárás, amelyet különböző betegségekben (kardiovaszkuláris betegségek, neurológiai és pszichiátriai problémák, szervátültetésen átesett egyének, daganatos betegek) szenvedő emberek gyógyszer-metabolizáló kapacitásának meghatározására dolgoztunk ki. A diagnosztikai rendszer a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP enzimek (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4) aktivitásának és expressziójának meghatározásán (CYP-fenotipizálás), valamint a DNS analízissel megállapítható génhibák kimutatásán (CYP-genotipizálás) alapul. A gyógyszer-lebontó képességről bizonyos mértékig tájékoztatást kaphatunk a fehérvérsejtek DNS analízisével. A gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP enzimek (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5) nagyfokú polimorfizmust mutatnak, amely csökkent működő képességű, esetleg működésképtelen enzim termelődéséhez, vagy enzimhiányhoz vezet. A fenotipizálás során a CYP enzimek kifejeződését egyrészt szelektív aktivitásuk alapján, másrészt a CYP mRNS szintek mérésével állapíthatjuk meg különös tekintettel a gyenge- és gyors metabolizáló fenotípusokra.

A gyenge gyógyszer-lebontó képességű ember teljes értékű életet él mindaddig, amíg egy olyan gyógyszerrel nem kezelik, amelynek átalakításában elsődlegesen az adott csökkent működő képességű (vagy hiányzó) enzim vesz részt. A diagnosztikai rendszer alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy előre jelezzünk egy esetleges enzimdefektet, amely befolyásolhatja a beteg gyógyszeres kezelését, csökkentve a felesleges gyógyszeres terhelést. A betegek életkilátásait javíthatja a gyógyszer-metabolizáló képesség gyengeségeinek időben való felismerése és a terápia ésszerű módosítása. A gyors metabolizáló egyéneknél pedig a gyógyszer dózisének emelésével javítható a terápia hatékonysága.

2. Irodalmi összefoglalás

2.1. A xenobiotikumok metabolizmusa

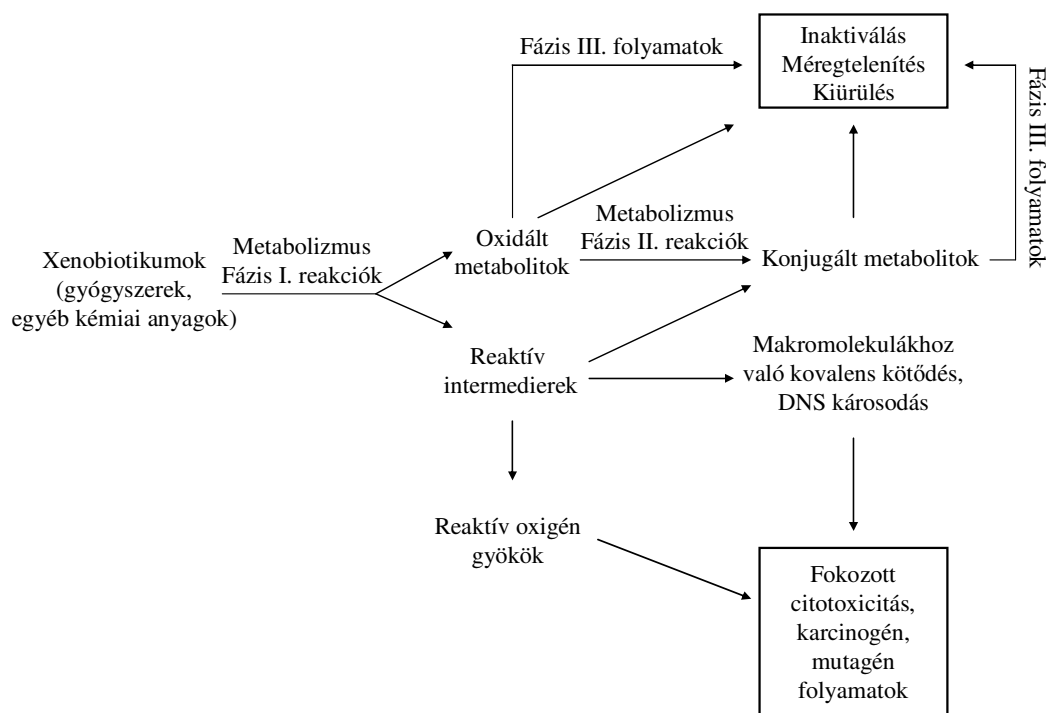
A szervezetbe kerülő testidegen anyagokat xenobiotikumoknak nevezzük, ide tartoznak a gyógyszerek, növényvédőszer, élelmiszer adalékanyagok, és egyéb környezetszennyező kémikáliák. A xenobiotikumok nagy része apoláris vegyület, ezért könnyen átjuthatnak a sejtmembránokon. A biotranszformáció a transzport folyamatokkal együtt a testidegen anyagok eliminálását eredményezi, amely egyfajta védelmet jelent a szervezet számára (Handschin et., 2003).

A méregtelenítés során a gyógyszerekből többnyire hidrófil, poláris metabolitok képződnek, melyek az epével és/vagy a vizelettel választódnak ki. A testidegen anyagok metabolizmusa két fázisra osztható: a fázis I. és fázis II. folyamatokra (1. ábra). A xenobiotikumok metabolizmusában (biotranszformációjában) elsősorban a monooxigenázok csoportjába tartozó CYP enzimek vesznek részt (Nelson et al., 1996; Nebert et al., 2002). Az egyes CYP enzimek aspecifikusak, több különböző szerkezetű szubsztrát átalakítását is végzik. Nagyrészt oxidálják a vegyületeket: aromás és alifás hidroxilezés, N-, O-, S-dezalkilezés, gyűrűzárás és gyűrűhasítás. Az oxidáción kívül azonban nagyrészt redukció is előfordulhat. Ezeket az imént említett átalakításokat nevezzük a metabolizmus fázis I. reakcióinak (Ziegler et al., 1994). A fázis I. metabolizmusban a CYP enzimeken kívül részt vesznek még az epoxid hidrolázok, észterázok, alkohol és aldehid dehidrogenázok és a flavinmonooxigenázok.

A fázis II. metabolizmus során maguk a xenobiotikumok, valamint a fázis I. reakciók során képződött metabolitok különböző endogén vegyületekkel konjugálódnak. A konjugációs folyamatok során keletkezett vegyületek polaritása és vízben való oldékonysága szintén növekszik, ami a szervezetből való kiüríthetőséget segíti (Jakoby et al., 1994). A legfontosabb konjugációs enzimek az UDP-glükuroniltranszferázok, glutation-S-transzferázok, szulfotranszferázok, metiltranszferázok és az N-acetiltranszferázok.

Ugyan a metabolizmus során többnyire méregtelenítés, a bekerülő testidegen anyagok inaktiválása történik, de reaktív intermedierek és oxigén gyökök is képződhetnek, melyek makromolekulákhoz kötődhetnek, DNS, fehérje károsodást okozhatnak és fokozott citotoxicitást mutagenitást/karcinogenitást idézhetnek elő. A karcinogén és mutagén folyamatokban és a prekarcinogének aktiválásában a CYP enzimeknek szintén jelentős szerepük van (Nebert et al., 1987) (1. ábra), ezért a fokozott CYP kifejeződés is problémát jelenthet.

Az elimináció harmadik lépcsőjét jelentik a fázis III. folyamatok (transzportfolyamatok), amit a transzporterek végeznek. A transzporterek transzmembrán fehérjék és kémiai szerkezetüket tekintve a legkülönbébb anyagok (például lipidek, szteroid típusú vegyületek, polipeptidek, ionok, gyógyszerek, metabolitok) szállítását végzik az extra- és intracelluláris membránokon keresztül (Stieger et al., 1998; Muller et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Bohan et al., 2002).

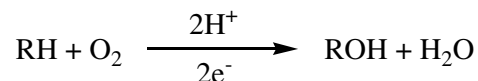


1. ábra: A xenobiotikumok átalakulása a szervezetben

2.2. A CYP enzimek jellemzése

A CYP enzimek a prokarióta és eukarióta szervezetekben egyaránt megtalálhatóak (Schenkman et al., 1993; Pinot et al., 1999; Gorman et al., 1998; Nelson., 1998). Hem-tiolát típusú enzimek, a citokróm P450 nevet onnan kapták, hogy a redukált CYP enzim szén-monoxiddal alkotott komplexe 450 nm-nél jellegzetes abszorpciós maximumot mutat (Soret-abszorpciós maximum) (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958; Frausto da Silva et al., 1991). A CYP enzimek működéséhez szükség van NADPH (α -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)-ra (elektron donor), molekuláris oxigénre és az úgynevezett NADPH-citokróm P450 oxidoreduktázra, amely az elektrontranszportot biztosítja (Lewis et al., 2000; Degtyarenko et

al., 1993). A CYP enzimek a molekuláris oxigénből származó egyik oxigénatomot építik be a szubsztrátba és ezzel párhuzamosan a másik oxigénatom vízkilépéssel távozik (Okita et al., 1992; Porter et al., 1991; Ortiz de Montenallos, 1995). A folyamathoz szükséges elektron transzportot a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktáz enzim mellett a citokróm b₅ is végzi. A CYP katalizált folyamat a következő bruttó egyenlettel írható le:



Az RH csoport jelenti a reakcióegyenletben a szerves szubsztrátot, míg az ROH jelöli az oxidált terméket (metabolit).

A CYP géncsalád aminosav szekvencia homológia alapján számos családra és alcsaládra osztható. Egy családba tartozó enzimek 40 %-os hasonlóságot mutatnak és 55 %-os homológia szükséges ahhoz, hogy egy alcsaládba soroljuk az egyes enzimeket. A CYP betűjel utáni első arab szám jelöli az enzimeszaládot, az azt követő betű (emberi CYP fehérjéknél nyomtatott nagybetű) az alcshaládot, és végül egy újabb arab szám jelöli magát a konkrét enzimet (pl.: CYP1A1).

A CYP gének kifejeződését endogén anyagok (pl. hormonok, citokinek), vagy különböző szerkezetű testidegen anyagok is szabályozhatják. Számos gyulladáskeltő anyagról kimutatták, hogy befolyásolja a CYP enzimek aktivitását és expressziójának mértékét. A xenobiotikumok gyakran fokozzák a CYP gének kifejeződését, aminek következtében megnő a CYP enzimszint, ami receptor függő módon megy végbe (részletesebben lásd a 2.5. fejezetben).

2.3. A CYP1-3 géncsalád jellemzése

A CYP1 géncsalád

A humán CYP1A családba tartoznak a CYP1A1, CYP1A2 és CYP1B1 enzimek. A CYP1B1 a CYP1A génekkal közös ősi génről vezethető le, mégis a CYP1B1 a 2. humán kromoszómán (2p21-22), a CYP1A1 és CYP1A2 gének pedig a 15. kromoszómán helyezkednek el (15q22-q24) (Tamási et al., 2003; Corchero et al., 2001). A CYP1A1 gén az extrahepatikus szövetekben, főleg a tüdőben expresszálódik alap állapotban, de indukció hatására a májban is kifejeződik. A CYP1A2 alapállapotban a májban is expresszálódik. A CYP1A1 és CYP1A2 enzimek indukálhatóak, főbb induktoraik a 3-metilkolantrén, a TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), ezen felül expressziójukat a dohányfüst és káposztafélék egyes komponensei is fokozzák. (A CYP1A1 gén expressziójának

szabályzásáról a 2.5. fejezetben részletesebben olvashatunk.) Legfőbb szubsztrátjaik a policiklusos aromás szénhidrogének és a dohányfüst egyes komponensei. A CYP1A2 ezen kívül részt vesz a fenacetin, teofillin és koffein metabolizmusában is.

A CYP2 géncsalád

A CYP2 géncsalád a legnépesebb család, a legtöbb CYP izoenzim idetartozik. A CYP2A gének különböző fajokban nagyfokú eltérést mutatnak mind szöveti kifejeződésben, mind aktivitásukban: emberben legnagyobb mennyiségben a májban fejeződnek ki. A humán CYP2A gének a CYP2F és CYP2B génekkel együtt a 19. kromoszómán (19q13.2) helyezkednek el (Hoffman et al, 1995). A CYP2A alcsalád tagjai közül csupán a CYP2A6, a CYP2A7 és a CYP2A13 gén aktív. A CYP2A7P(T) és a CYP2A7P(C) pszeudogének bázisszekvenciája nagyfokú homológiát mutat a CYP2A7-tel, de két deléció a 3. és 4. exonon „frameshift” mutációt okoz, így a kódolt fehérje képtelen hem kötésére, amely működésképtelen enzimet eredményez (Fernandez-Salguero et al, 1995; Tamási et al, 2006).

A humán CYP2B alcsaládba két aktív gén tartozik, a CYP2B6 és a CYP2B7, amelyek a 19. kromoszómán találhatóak (19q13.2) (Tamási et al, 2006; Hoffman et al, 1995). A májban csak a CYP2B6 fejeződik ki, a CYP2B7 a tüdőben expresszálódik. Főbb szubsztrátjai az etilmorfin, az etoxikumarin, 6-aminokrizén, a ciklofoszfamid, a metadon és a tesztoszteron (16- α/β hidroxilezés). Számos vegyület képes indukálni, például a fenobarbitál, a fenitoin, a 4,4'-diklórdifenil-triklóretán (DDT). A CYP2B6 gén transzkripciójának szabályzása a 2.5. fejezetben kerül részletes ismertetésre.

A humán CYP2C géncsalád négy különböző enzimet kódol (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 és CYP2C19), amelyek a 10. kromoszómán (10q23.33) helyezkednek el a következő sorrendben: CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8 (Gray et al, 1995; Tamási et al., 2006). Elsődlegesen a májban expresszálódnak, de a vékonybélben és más extrahepatikus szövetben is kimutathatók. A humán CYP2C enzimes család szubsztrátspektruma igen széles, számos gyógyszer-molekulát képesek metabolizálni. A CYP2C9 a warfarin 7-hidroxilezését végzi és szubsztrátjai még a fenitoin, a tienilsav, a tolbutamid és a diclofenac. A CYP2C19 a warfarin 6- vagy 8-hidroxilezését végzi, ezen felül metabolizálja az S-mephenitoint, az omeprazolt, a diazepamot és az imipramint. A CYP2C8 és CYP2C18 szubsztrát-specifitása közel áll a CYP2C9-hez, illetve a CYP2C19-hez, de általában alacsonyabb V_{max} vagy magasabb K_m értéket mutatnak (Richardson et al, 1996). Nincs ismeretünk olyan vegyületről, amit kizárólag a CYP2C18 alakítana át, de több olyan vegyületet nem képes metabolizálni, amelyek jellemzően a CYP2C9 és a CYP2C19 szubsztrátjai (tienilsav, arachidonsav). A

CYP2C19 katalizálja számos gyógyszervegyület metabolizmusát: mefenitoin, omeprazol, proguanil és egyes barbiturátok (2.4. fejezet). A *CYP2C* gének kifejeződését számos olyan vegyület indukálja, amely egyben induktora a *CYP2B6* és *CYP3A* enzimeknek is (fenobarbitál, dexametazon, rifampicin). Az indukció folyamatáról részletesebben a 2.5. fejezetben olvashatunk.

A humán *CYP2D* alcsalád három gént tartalmaz (*CYP2D6*, *CYP2D7P* és *CYP2D8P*), melyek egymást követve a 22. kromoszómán (22q13.1) található. A *CYP2D7P* és *CYP2D8P* inaktív pszeudogének. A *CYP2D7P* inaktiválódásáért az 1. exonban levő inzerció a felelős, ami eltolódást (frameshift) hoz létre. Következménye egy, a kódoló génszakasz közepén levő stop kodon. A *CYP2D8P* számos mutációt tartalmaz, ami a transzkripció rendszer működésképtelenségét okozza (nincs működő TATA box) (Kimura et al, 1989; Tamási et al., 2006). A *CYP2D6* enzim számos gyógyszer metabolizmusáért felelős: debrizokvin, atenolol, kodein, metadon, dextrometorfán, propranolol, amitriptilin, továbbá antidepresszánsok és béta-blokkolók. Emberben a *CYP2D6* az egyetlen működő *CYP2D* enzim, amelyre komoly klinikai következményekkel járó genetikai polimorfizmus jellemző (Tamási et al., 2006; Zhou et al., 2009; Ingelman-Sundberg et al., 2005). A genetikai háttér nagyban meghatározza a fenotípust, mert a *CYP2D6* gén nem indukálható, az enzim kifejeződését jelenlegi tudásunk szerint a xenobiotikumok nem módosítják. A humán *CYP2D6* enzim 2 %-ban fordul csak elő a májban a többi *CYP* enzimhez viszonyítva. A forgalomban lévő gyógyszerek metabolizmusáért azonban 25 %-ban felelős (Ingelman-Sundberg et al., 2007). A *CYP2D6* enzimfehérjét kisebb-nagyobb mértékben kimutatták a bélfalban, az emlőben, a tüdőben, a méhlepényben és az agyban is (Zhou et al., 2009). A *CYP2D6* gén szabályozása még nem teljesen ismert, a regulációért felelős transzkripció faktorok szerepét még nem tisztázták.

A *CYP2E* alcsaládba egyetlen gén tartozik, a *CYP2E1*, amely emberben a 10. kromoszómán (10q26.3) található. A gyógyszerek lebontásában viszonylag kevés szerepe van, az enzim kis molekulásúlyú vegyületek (alkoholok, aldehidek, halogénezett anesztetikumok, zsírsavak, kloroform, piridin, acetaminofen, klórzoxazon) metabolizmusában vesz részt, ezen kívül felelős egyes prekarcinogén anyagok (nitrozaminok, nitrozopirolidin) metabolikus aktiválásáért. A *CYP2E1* részt vesz az acetaminofen (paracetamol) metabolizmusában, aminek következtében a paracetamolból toxikus N-acetil-p-benzoquinon-imin keletkezik (Hazai et al., 2002). A *CYP2E1* enzim indukciója főleg poszt-transzkripció és poszt-transzláció szinten szabályozódik.

A CYP3A géncsalád

A CYP3A alcsalád tagjai a 7. kromoszómán helyezkednek el (7q22.1) (Smith et al, 1998), ide soroljuk a CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 és CYP3A43 enzimet. A CYP3A gének 25 kb (kilobázis) hosszúak, 13 exonból és 12 intronból állnak (Tamási et al., 2006; Zhou et al., 2009). A CYP3A enzimek flexibilisek, szubsztrát-spektrumuk széles, szerkezetileg igen eltérő vegyületek metabolizmusát is képesek katalizálni: eritromicin, ciklosporin A, takrolimusz, lidokain, nifedipin, etilmorfin, tamoxifen, lovasztatin, tesztoszteron. Induktoraik nemcsak endogén molekulák (glukokortikoidok, epesavak) lehetnek, hanem számos exogén anyag is képes a CYP3A gének transzkripcióját fokozni: rifampicin, fenobarbitál, dexametazon, troleandomicin (Maurel, 1996). A CYP3A4 enzim mennyiségében akár 60-100-szoros különbség is mutatkozhat a humán populáción belül. A CYP3A4 a CYP enzimek közül a legnagyobb mennyiségben fordul elő.

A CYP3A4 és a CYP3A5 cDNS szekvenciája 90 %-os hasonlóságot mutat (Gellner et al, 2001). A CYP3A5 a humán májban kisebb mennyiségben (10-30 %) van jelen, mint a CYP3A4, azonban a vesében a legnagyobb mennyiségben expresszálandó CYP3A enzim (Koch et al, 2002). Szubsztrátspecificitása nagyon hasonló a CYP3A4-hez, azonban enzimaktivitása többnyire szignifikánsan alacsonyabb, sőt egyes esetekben teljesen inaktívnak bizonyult (eritromicin, kinidin, 17 β -ösztradiol) (Maurel, 1996). A takrolimuszt azonban a CYP3A5 intenzívebben képes metabolizálni, mint a CYP3A4. Így a transzplantáción átesett betegek immunszuppresszáns kezelése során jelentős eltérések mutatkozhatnak az egyes betegek között a CYP3A5-nek köszönhetően (Dai et al, 2006), ugyanis a CYP3A5 expressziója jelentős polimorfizmust mutat (2.4. fejezet).

2.4. Jelentősebb genetikai variációk a CYP1-3 géncsaládban

Az 1. és 2. táblázat összefoglalja a gyógyszer-metabolizmust érintő, komolyabb klinikai következményekkel járó CYP génhibákat és a különböző populációkra jellemző előfordulási gyakoriságaikat.

1. táblázat: CYP génhibák és következményeinek összefoglalása
(<https://www.cypalleles.ki.se>)

CYP gén	Allél	Elhelyezkedés		Poszt-transzkripció és fehérje szintű hatások	Enzim aktivitásra gyakorolt hatás
		cDNS, DNS	Gén		
CYP2C9	*2	430C>T	3. exon	R144C	redukált NADPH-citokróom P450 reduktáz affinitás
	*3	1075A>C	7. exon	I359L	szubsztrát specifitás változás
CYP2C19	*2	681G>A	5. exon	splicing hiba	inaktív enzim
	*3	636G>A	4. exon	splicing hiba	inaktív enzim
CYP2D6	*3	2549delA	5. exon	frameshift	inaktív enzim
	*4	1846G>A	3. intron	splicing hiba	inaktív enzim
	*5	teljes gén deléció	-	CYP2D6 deléció	nincs enzim
	*6	1795delT	3. exon	frameshift	nincs enzim
CYP3A5	*3	6986A>G	3. intron	splicing hiba	nincs enzim

2. táblázat: Allél gyakoriságok (Zhou et al., 2009; Miners et al., 1998; Scordo et al., 2004; de Morais et al., 1994; Gardiner et al., 2006; Ingelman-Sundberg et al., 2005; Thompson et al., 2004)

CYP gén	Allél	Allél gyakoriságok az egyes populációkban		
		kaukázusi	ázsiai	afrikai-amerikai
CYP2C9	*2	8-13%	0%	3%
	*3	7-9%	1-2%	2%
CYP2C19	*2	9-14%	30%	20-25%
	*3	<1%	5%	<1%
CYP2D6	*3	2%	0%	2%
	*4	12-21%	1%	6-7%
	*5	4-6%	4-6%	4-6%
	*6	1%	Nincs adat	1%
CYP3A5	*3	90-93%	70%	50%

Az 1. táblázatban felsorolt CYP gén mutációk csökkent működő képességű, vagy inaktív enzimet eredményeznek és a működőképes enzim teljes hiányát is okozhatják. Gyenge metabolizálóknál általában mindkét allél mutációt hordoz (homozigóta mutáns genotípus), de a heterozigóta genotípus is többnyire csökkent metabolizáló képességet eredményez.

A gyógyszer vérszint monitorozás során a gyógyszer beadását követően az idő függvényében mért vér (illetve plazma vagy szérum) koncentrációk alapján meghatározzák a gyógyszer AUC (area under the plasma concentration-time curve) és clearance értékeit.

Gyenge metabolizálók (homozigóta mutáns, illetve heterozigóta genotípus) esetében magasabb vérkoncentrációk jelentkeznek, és az adott gyógyszer AUC értéke nagyobb, míg clearance értéke kisebb, mint az átlagos metabolizáló fenotípusú egyéneknél. Az extenzív vagy gyors metabolizálók homozigóta vad genotípust hordoznak. A CYP2D6 enzimrel kapcsolatosan említést kell tenni az ultra-gyors metabolizálókról, akiknél a *CYP2D6* gén duplázódása, vagy akár sokszorozódása miatt a CYP2D6 szubsztrátok fokozott metabolizmusa figyelhető meg. Az extenzív, vagy ultra-gyors metabolizáló fenotípusú csoportoknál alacsonyabb vérszintek, kisebb AUC, illetve magasabb clearance értékek jelentkeznek (Zhou et al., 2009). Ha a farmakológiai hatást az anyavegyület fejt ki, a gyenge metabolizálóknál fokozott hatás, vagy toxikus mellékhatások jelentkezhetnek, ami akkor okoz főként gondot, ha az adott gyógyszer metabolizmusáért kizárólag a csökkent működőképességű, inaktív, vagy hiányzó enzim a felelős. Ha maga a gyógyszer vegyület inaktív (prodrug), de a fő metabolitja felelős a farmakológiai hatásért, a CYP-génhibák csökkent farmakológiai hatáshoz, illetve a hatás elmaradáshoz vezethetnek. A CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 enzimek nagyfokú polimorfizmust mutatnak, számos gyógyszer metabolizmusában jelentős szerepet játszanak, így a génhibák farmakokinetikai és toxikológiai következménnyel járhatnak.

2.4.1. A CYP2C9 enzim és klinikai jelentőséggel bíró génhibái

A CYP2C9 enzim 490 aminosavból áll, 55,6 kDa molekulatömegű és hat szubsztrát felismerő helyet tartalmaz. Feltételezett aktív helye egy α hélixből, egy fenil (hidrofób) kötőhelyből, a porfirin vázból és egy kationos kötőhelyből áll. A CYP2C9 enzimnek hat szubsztrát felismerő helye van: 96-117, 198-205, 233-240, 286-304, 359-369 és 470-477. Szubsztrátjainak egy része gyenge sav (3. táblázat), a szubsztrát elektronegatív és az enzim elektropozitív részei között elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel. A CYP2C9 enzim működése során az enzimfehérje egyes felszíni lizin és arginin aminosavai elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktáz enzimen található ellentétes töltésű aminosav oldalláncokkal. A CYP2C9 enzim 35 allél variánsát ismerik, amik többnyire pontmutációk következményei, és gyakran csökkent működőképességű enzimet eredményeznek (Tracy et al, 2002; Bhasker et al, 1997; Tamási et al., 2006). A kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló CYP2C9 génhibák (CYP2C9*2 és CYP2C9*3) a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktázzal való kapcsolatban, illetve a szubsztrát felismerésben okoznak zavart (1. táblázat).

3. táblázat: Főbb CYP2C9 szubsztrátok

<u>Szubsztrátok*</u>
Véralvadás gátlók: S-acenokumarol, fenprocoumon, S-warfarin
Antiepileptikumok: fenitoin, fenobarbitál, valproát
Angiotenzin II receptor gátlók: lozartan, irbezartan, kandezartan
Vízajtók: torasemid, szulfonpirazon
NSAIDs (nem-szteroid gyulladáscsökkentők): diklofenak, ibuprofen, ketopren, suprofen, naproxen, flurbiprofen, indometacin, meloxicam, piroxicam, tenoxicam, lornoxicam
COX2 (Ciklooxygenáz 2) gátlók: celecoxib, lumiracoxib, etoricoxib, valdecoxib
Orális vércukorszint csökkentők: tolbutamid, gliburid, glimepirid, gliklazid, glipizid
Daganat ellenes gyógyszerek: ciklofoszfamid, tamoxifen
Antibiotikumok: Szulfametoxazol, trimethoprim

*Zhou et al, 2009; Miners et al., 1998; Rettie et al., 2005

CYP2C9*2 génhiba: A CYP2C9*2 egy 430C>T bázis cserét jelentő pontmutáció a CYP2C9 gén 3. exonján, ami egy arginin - cisztein aminosav cserét okoz a 144-es pozícióban (R144C) (Rettie et al., 1994). Az Arg144-es aminosav fontos szerepet játszik a CYP2C9 és a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktáz közötti kölcsönhatás kialakításában, így az enzim csökkent affinitását eredményezi a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktázhoz, mert a bázikus aminosav oldallánc csere miatt gyengül az enzimek között föllépő elektrosztatikus kölcsönhatás (1. táblázat). Ez csökkent enzimaktivitást eredményez. Ezen aminosav csere nem esik bele a szubsztrát felismerőhelyek egyikébe sem, így a szubsztrátok kötődését nem befolyásolja (H Yamazaki et al, 1998).

CYP2C9*3 génhiba: A CYP2C9*3 egy 1075A>C bázis cserét jelentő pontmutáció a CYP2C9 gén 7. exonján, ami egy izoleucin - leucin cserét eredményez a 359-es helyen (Sullivan-Klose et al, 1996). Az I359L aminosav csere az ötös szubsztrát felismerő helyen található, és jelentősen lecsökkenti például a tolbutamid és fenitoin hidroxilációt (H. Yamazaki et al., 1998), de a diklofenak hidroxilációt nem befolyásolja szignifikánsan. Ezen kívül erősen gyengül az S-warfarin és a vaproát eliminációja is, magasabb vérszinteket és hosszabb felezési időt eredményezve. Az említett gyógyszerek eliminációjának csökkenése az aminosav csere miatt kialakult sztérikus gátlás eredménye (1. táblázat). A szubsztrátfelismerő helyen történő aminosav csere (CYP2C9*3) általában drasztikusabb aktivitás csökkenést okoz, mint a CYP2C9 enzim NADPH-citokróm P450 oxidoreduktázzal való csökkent kölcsönhatása (CYP2C9*2).

A CYP2C9*2 és CYP2C9*3 génhibák klinikai következményei

A CYP2C9*2 és CYP2C9*3 génhibák csökkent működő képességű enzimet eredményeznek, és jelentős hatással lehetnek a véralvadás gátlók, az antiepileptikumok, az angiotenzin II receptor gátlók, a vízhajtók, a nem-szteroid gyulladáscsökkentők és a vércukor-szint csökkentők (3. táblázat) metabolizmusára.

A véralvadás gátlók közül egyik legjelentősebb gyógyszer a warfarin, ami egy K vitamin antagonist, és leggyakrabban trombotikus problémáknál alkalmazzák (mély vénás trombózis, szívinfarktus, 'stroke') (Goodstadt et al., 2004; Rost et al., 2004). A CYP2C9 génhibák az S-warfarin hidroxilációját befolyásolják: a vad típushoz (CYP2C9*1) viszonyítva a CYP2C9*2 mutáció miatt 12 %, míg a CYP2C9*3 mutáció miatt mindössze 5 % enzimaktivitás mérhető (Gage et al., 2008). A CYP2C9*3 homozigóta mutáns betegeknél az S-warfarin kiürülése 90 %-os csökkenést eredményezett a homozigóta vad genotípusú egyénekhez viszonyítva, ezért csökkentett dózis adása javasolt a két hibás CYP2C9*3 allélt hordozó embereknél, mert ezen betegeknél fokozottan fenn áll a vérzékenység kialakulásának veszélye (Zhou et al., 2009).

Ho és munkatársai (2003) a CYP2C9 polimorfizmus valproát (antiepileptikum) lebontásra gyakorolt hatását vizsgálták, összehasonlították a májkárosító 4-én valproát és az inaktív 4-hidroxi és 5-hidroxi valproát képződés mértékét a vad típusú, illetve a mutációt hordozó enzimek esetében. A CYP2C9*2 és CYP2C9*3 enzimek eltérő K_m és V_{max} értékeket mutattak. A csökkent enzimaktivitás a CYP2C9*2 mutáció esetében csökkent V_{max} értéket mutatott, míg a CYP2C9*3-nál a megnövekedett K_m érték volt a jellemző. Ez is alátámasztja azt a feltevést, hogy a CYP2C9*3 mutáció egy szubsztrát felismerő helyen van, míg a CYP2C9*2 génhiba nem befolyásolja a szubsztrát kötődését. A CYP2C9*2 enzimaktivitása 48, 44 és 44 %-kal csökkent a 4-én valproát, a 4-hidroxi valproát és az 5-hidroxi valproát metabolitok képződésében a vad típushoz (CYP2C9*1) viszonyítva. A CYP2C9*3 génhibánál egy nagyobb mértékű enzimaktivitás csökkenés volt megfigyelhető a valproát metabolit keletkezésében (85, 83 és 88 %-os csökkenés). A génhibák következtében csökken ugyan az erősen májkárosító 4-én metabolit keletkezésének mértéke, de a szintén toxikus valproát viszont felhalmozódhat. Saját vizsgálataink is azt mutatták, hogy a CYP2C9*3/*3

homozigóta mutáns betegeknél megnövekedik a valproát vérszint és ezzel együtt jelentős toxikus gyógyszer mellékhatások is jelentkeznek (5.10.1. fejezet).

A lozartan az első szelektív angiotenzin II receptor antagonistá, amit magas vérnyomás és az ebből adódó szívbetegségek kezelésére alkalmaznak (Timmermans et al., 1993). A vérnyomás csökkentő hatást a lozartan aktív metabolitja, a lozartan 5-karboxisav fejt ki, képződése a CYP2C9 enzim mellett a CYP3A4 működésének is köszönhető. Azon egyéneknél, akik CYP2C9*3 mutáns allélt hordoznak (homozigóta mutáns, vagy heterozigóta genotípusúak), jóval alacsonyabb lozartan 5-karboxisav vérszintek alakultak ki (7-50 %), mint a homozigóta vad típusú betegeknél és ezzel párhuzamosan magasabb vérnyomást figyeltek meg náluk (Sekino et al., 2003). A CYP2C9*2 génhiba ugyanakkor nem befolyásolta jelentősen az aktív metabolit keletkezését (Yasar et al., 2002). A kutatásokból az is kiderült, hogy a CYP2C9 polimorfizmus befolyásolta a lozartan vérszintjét, azonban magasabb lozartan koncentráció (>24 µM) esetében már a CYP3A4 is jelentős mértékben részt vett a lozartan oxidációjában.

A torasemid (vagy torsemid) egy szulfonil-karbamid típusú vízajtó vegyület, amit pangásos szívbetegség következtében kialakult ödéma kezelésére használnak (Bagshaw et al., 2007). Metabolizmusában főként a CYP2C9 enzim vesz részt. Egy tanulmányban 36 egészséges önkéntest vizsgáltak meg, és 1,5, 1,7 és 2,8-szoros AUC értékeket kaptak a CYP2C9*1/*3, *2/*3 és *3/*3 genotípusú egyéneknél a homozigóta vad típusúakhoz viszonyítva (Vormfelde et al., 2004). A CYP2C9*3 alléllal rendelkező egyéneknél megnövekedett elektrolit, és csökkent húgysav kiválasztás volt jellemző a gyógyszer bevételtől számított 8 órán belül.

A flurbiprofen (nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő) egy fenilkarboxilsav származék, amelyet egyrészt különböző ízületi gyulladások tüneti kezelésére, másrészt lázcsillapítóként és fájdalomcsillapítóként is használnak. A flurbiprofen 4'-hidroxilációját a CYP2C9 katalizálja, a flurbiprofen 45 %-ban ezen az útvonalon keresztül távozik a szervezetből (Davies, 1995; Yamazaki et al., 1998). A flurbiprofen AUC értéke 1,7-szer, illetve 1,4-szer volt magasabb a CYP2C9*1/*3 és CYP2C9*1/*2 heterozigóta egyéneknél a homozigóta vad típusúakhoz viszonyítva. A flurbiprofen metabolikus clearance értékei jelentősen alacsonyabbak voltak (39 %-al alacsonyabb érték) a CYP2C9*1/*3 genotípusú egyéneknél, míg a CYP2C9*1/*2 heterozigóta személyeknél kisebb mértékben csökkentek le a clearance értékek (27 %-os clearance csökkenések) a homozigóta vad típusúakhoz viszonyítva (Lee et al., 2003; Zhou et al., 2009).

A szulfonil karbamid típusú vércukor-szint csökkentőket elsősorban II típusú cukorbetegség kezelésére használják. A tolbutamid, klórpropamid, tolazamid és acetohexamid első generációs szulfonil karbamid vegyületek. Fő metabolikus útvonaluk a CYP2C9 által katalizált aromás gyűrű hidroxilezés. A hidroximetabolitoknak már sokkal kisebb vércukor-szint csökkentő hatásuk van, mint az anyavegyületeknek. (Lasker et al., 1998; Zhou et al., 2009). A gliburid egy második generációs vércukor-szint csökkentő gyógyszer, ami jól alkalmazható a terhességi cukorbetegségben szenvedő nők vércukor-szintjének beállítására (Kimber-Trojnar et al., 2008). A gliburid lebontása elsősorban a májban történik, és két fő metabolitot azonosítottak a vizeletből, a 4-transz-hidroxiciklohexil gliburidot és 3-cis-hidroxiciklohexil gliburidot. Mindkét metabolit farmakológiailag aktív, és erős vércukor-szint csökkentő hatása van (Rydberg et al., 1994). A gliburid metabolizmusában fontos szerepet játszanak a CYP3A4, a CYP2C9 és CYP2C19 enzimek. A CYP2C9*3 génhiba következtében a tolbutamid, gliburid, glimepirid és nateglinid clearance jelentősen lecsökken. A CYP2C9*1/*3 heterozigóta, és a CYP2C9*3/*3 homozigóta mutáns betegeknél a tolbutamid AUC értékek 2, illetve 6-szor magasabbak voltak, mint a homozigóta vad típusúaknál. A tolbutamiddal kezelt CYP2C9*1/*3, illetve CYP2C9*3/*3 genotípusú egyéneknél gyorsabban csökkent a vércukor-szint, mint a homozigóta vad típusú betegeknél, mert a fő 4-hidroxi-tolbutamid metabolitnak jóval kisebb vércukor-szint csökkentő hatása van, mint az anyavegyületnek. A gliburid-kezelt betegeknél azonban kisebb mértékű változást észleltek a vércukor-szintben a CYP2C9*3 homozigóta mutáns, illetve heterozigóta egyéneknél, ugyanis a metabolitok vércukor-szint csökkentő hatása az anyavegyülethez hasonló (Zhou et al., 2009).

A szulfametoxazol és a trimetoprim bakteriosztatikus vegyületek, gyógyszerként az 5:1 arányú keveréküket alkalmazzák. Elsősorban *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, és *Escherichia coli* baktériumok által okozott fertőzések kezelésére használják. A szulfametoxazol N-hidroxilációját nagyrészt a CYP2C9 enzim végzi. A CYP2C9*2, illetve CYP2C9*3 mutációk hatására 3-, illetve 20-szoros csökkenést tapasztaltak az „intrinsic clearance” értékekben (Gill et al., 1999). A trimetoprim metabolizmusában is elsődlegesen a CYP2C9 enzim vesz részt (<https://life-science.kyushu.fujitsu.com/admedb>).

2.4.2. A CYP2C19 enzim és a klinikai jelentőséggel bíró génhibái

A CYP2C19 enzim egy 490 aminosavból álló fehérje, amit a 9 exonból álló *CYP2C19* gén kódol. A májban expresszálandó CYP enzimek nem egész 2%-át teszi ki a CYP2C19, ugyanakkor a forgalomban levő gyógyszerek mintegy 10 %-ának a metabolizmusában vesz részt (4. táblázat). A CYP2C19 közel 35 allél variánsát azonosították eddig, számos közülük működésképtelen enzimet eredményez (CYP2C19*2-CYP2C19*8) (Ibeanu et al., 1999; www.cypalleles.ki.se).

4. táblázat: Fontosabb CYP2C19 szubsztrátok

<u>Szubsztrátok*</u>
Proton pumpa gátlók (PPIs): omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol
Barbiturátok: hexobarbital, mefobarbital, fenobarbital
Benzodiazepinek: diazepam, flunitrazepam, quazepam, clobazam
Szelektív szerotonin visszavétel gátlók: citalopram, fluoxetin, sertralin, moclobemide
Triciklusos antidepresszánsok: imipramin, amitriptilin, nortriptilin
Egyéb gyógyszerek: fenitoin, S-mefenitoin, bortezomib, vorikonazol, selegilin, nelfinavir, proguanil

* Zhou et al, 2009

CYP2C19*2 génhiba: A CYP2C19*2 génhiba egy G>A cserét jelent a 681. helyen az 5. exonon (1. táblázat), ami hibás 'splicing'-hoz vezet. A 'splicing' hiba miatt a *CYP2C19* génről szintetizálódott RNS rendellenes érési folyamaton megy keresztül, így hibás mRNS termelődik, amely teljesen inaktív enzimfehérjét eredményez.

CYP2C19*3 génhiba: A CYP2C19*3 génhiba egy G>A cserét jelent a 636. helyen a 4. exonon (1. táblázat), ami szintén egy 'splicing' rendellenességet okoz. A termelődő hibás CYP2C19 mRNS-ről ugyancsak egy teljesen inaktív fehérje fejeződik ki. Ez a génhiba a kaukázusi populációban igen ritka (<1 %) (2. táblázat).

Mind a CYP2C19*2, mind a CYP2C19*3 mutációk teljes enzimaktivitás veszteséget okoznak. A CYP2C19*2, illetve CYP2C19*3 mutáns allélt hordozó egyéneket az S-mefenitoin metabolizáló képesség alapján két fenotípus csoportba sorolták be. A gyenge

metabolizáló fenotípushoz a CYP2C19*2/*2, CYP2C19*3/*3, illetve CYP2C19*2/*3 genotípusú egyéneket sorolták. Az extenzív metabolizáló személyek közé a CYP2C19*1/*2, CYP2C19*1/*3, illetve a CYP2C19*1/*1 genotípusúak tartoznak (de Morais et al., 1994).

A CYP2C19*2 és CYP2C19*3 génhibák klinikai következményei

Mivel a CYP2C19*2 és CYP2C19*3 mutációk teljes aktivitás vesztes okoznak, számos gyógyszer metabolizmusa jelentősen módosulhat (pl a 4. táblázatban felsoroltak). A proton pumpa gátlók (pl. omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol) visszaszorítják a gyomorsav kiválasztást azáltal, hogy kölcsönhatásba lépnek a gyomorfal sejtjeiben lévő H^+/K^+ -ATPáz enzimekkel. (Andersson et al., 2008). A proton pumpa gátlók metabolizmusában több mint 80 % -ban vesz részt a CYP2C19 enzim, azonban kis mértékben a CYP3A4, illetve a CYP2C9 is hozzájárul a lebontáshoz. Így a CYP2C19 genotípus nagyban befolyásolja a proton pumpa gátlók farmakokinetikai tulajdonságait, ami kihat a *Helicobacter pylori* fertőzések és a gyomor és nyelőcsővel kapcsolatos reflux rendellenességek terápiájának hatékonyságára (Furuta et al., 2007). A gyenge metabolizálónál a magasabb AUC és hatékonyabb savlekötés következtében a *H. pylori* pusztulás mértéke nagyobb (Furuta et al., 2001). A proton pumpa gátlók széles terápiás indexszel rendelkező gyógyszerek. Annak ellenére, hogy a gyenge metabolizálónál jelentősen megnő a proton pumpa gátlók AUC értéke, nincs elegendő bizonyíték arra, hogy megnövekedne a mellékhatások megjelenése.

A CYP2C19 enzim számos barbiturát, mint például a hexobarbitál (Kato et al., 1990), mefobarbitál (Kobayashi et al., 2004) és fenobarbitál metabolizmusáért felelős. A fenobarbitál metabolizmusának azonban csak kis részét képezi a CYP2C19 által katalizált eliminációs útvonal. A mefobarbitál sztereoszelektív metabolizmuson megy keresztül, az R-mefobarbitált 80 %-ban a CYP2C19 enzim alakítja át a 4'-hidroxi-metabolittá, míg az S-mefobarbitált nagyrészt a CYP2B6 enzim alakítja át N-demetilációval fenobarbitállá (ez a fő metabolit a vérplazmában) (Kobayashi et al., 1999). Egy japán epilepsziás betegekkel foglalkozó tanulmány 20 %-al alacsonyabb fenobarbitál clearance-t mutatott ki a gyenge metabolizáló csoportban az extenzív metabolizálókhoz viszonyítva (Mamiya et al., 2000). Ugyanakkor egyszeri racemát mefobarbitál adagolásakor az R-mefobarbitál AUC értéke 92-szer magasabb volt a gyenge metabolizálónál, mint a homozigóta extenzív metabolizálók esetében (Kobayashi et al., 2004), míg az S-mefobarbitál AUC értéke nem változott a CYP2C19 genotípus függvényében. *In vivo* és *in vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy az R- és S-

hexobarbitál clearance alacsonyabb volt a gyenge, mint az extenzív metabolizáló egyéneknél (Adedoyin et al., 1994; Knodell et al., 1988; Yasumori et al., 1990).

A benzodiazepinek (4. táblázat) metabolizmusát főként a CYP2C19, kisebb részben a CYP3A4 és CYP2B6 enzim katalizálja. (Perloff et al., 2000; Zhou et al., 2009). A diazepam egy széles körben elterjedt izomlazító, nyugtató és epilepszia elleni gyógyszer. Az N-demetilált származék egy aktív metabolit és egyben a diazepam fő metabolitja (Jack et al., 1983). A diazepam 3-as szénatomon történő hidroxilációjával keletkezik a temazepam, majd annak N-demetilálódásával az oxazepam, amik szintén aktív metabolitok (Zhou et al., 2009). A legtöbb etnikai csoportban (Kaukázusi, Japán, Koreai, Kínai) a CYP2C19 genotípus hasonló hatással van a diazepam metabolizmusra, mint az S-mefenitoin hidroxilációra. Az S-mefenitoint gyengén metabolizáló kaukázusi és koreai populációkban kétszer olyan magas diazepam AUC volt megfigyelhető, mint az extenzív metabolizálóknál (Bertilsson et al., 1989). Mivel a CYP2C19 enzim a diazepam és a dezmetil diazepam metabolizmusában egyaránt részt vesz, a gyenge metabolizálóknál nemcsak a diazepam, hanem a dezmetil diazepam koncentrációja is megnő a vérplazmában a CYP2C19 enzim működésképtelensége miatt. Mivel mindkét vegyület hasonló farmakológiai hatással rendelkezik (izomlazító, nyugtató), a gyenge metabolizáló betegeknél hosszabb ideig tart a gyógyszer hatás megszűnése (Inomata et al., 2005). A klobazam az 1,5-benzodiazepinek közé tartozó antiepileptikum. A metabolizmus során elsősorban N-dezmetil-klobazammá (norklobazam) alakul, ami egy farmakológiailag aktív metabolit. Az N-dezmetil-klobazamot a CYP2C19 enzim 4'-hidroxi N-dezmetil-klobazammá alakítja át (Giraud et al., 2004). A két reakciólépést nagyobb részben a CYP2C19, míg kisebb részben a CYP3A4 enzim katalizálja (Giraud et al., 2004). Seo és munkatársai (2008) tanulmányukban 111 japán epilepsziás beteget vizsgáltak meg és azt találták, hogy a klobazam antiepileptikus hatása szignifikánsan megnövekedett a gyenge metabolizálók körében.

A CYP2C19 számos szelektív szerotonin visszavételt gátló hatóanyag (pl. citalopram, fluoxetin, sertralin) metabolizmusát katalizálja. Ugyanakkor a CYP2D6 és kisebb mértékben a CYP2C9 és a CYP3A4 is részt vesz az eliminációban (Kobayashi et al., 1997; Olesen et al., 1999; Zhou et al., 2009; Margolis et al., 2000; Kobayashi et al., 1999). A CYP2C19 gyenge metabolizálóknál jelentősen magasabb citalopram (Herrlin et al., 2003; Sindrup et al., 1993), fluoxetin (Liu et al., 2001) és sertralin (Wang et al., 2001) plazma koncentrációkat figyeltek meg. Egyes szerzők (Scordo et al., 2005; Zhou et al., 2009) azonban nem találtak összefüggést a szelektív szerotonin visszavételt gátlók és metabolitjaik steady-state vérkoncentrációja és a CYP2C19 genotípus között. Ugyanis a CYP2C19 polimorfizmusnak

akkor van elsősorban jelentősége, ha a párhuzamos metabolikus útvonalak sem működnek megfelelően. Ezért a szelektív szerotonin visszavételt gátlóknál a CYP2C19 és CYP2D6 polimorfizmusokat egyszerűen célszerű figyelembe venni.

A tercier amin triciklusos antidepresszánsok közé tartozó amitriptilint, imipramint, klomipramint és doxepint (Zhou et al., 2009) intenzíven alakítja át a CYP2C19 és CYP2D6 enzim szekunder amin metabolittá (Mellstrom et al., 1981; Nielsen et al., 1996; Haritos et al., 2000; Zhou et al., 2009). A metabolizmusban kisebb mértékben részt vesz még a CYP2C9, CYP3A4 és CYP1A2 enzim is. Mind a tercier, mind a szekunder aminok farmakológiailag aktívak és ez utóbbiak metabolizmusában elsősorban a CYP2D6 enzim vesz részt (Breyer-Pfaff et al., 1997; Zhou et al., 2009). Összességében a triciklusos antidepresszánsok metabolizmusában meghatározó szerepe van a CYP2C19-nek, így a CYP2C19 genetikai polimorfizmusa hasonló eltéréseket okoz a triciklusos antidepresszánsok metabolizmusában, mint az S-mefenitoin esetében.

2.4.3. A CYP2D6 enzim és klinikai jelentőséggel bíró génhibái

A 9431 bázispár hosszú *CYP2D6* gén a 22-es kromoszómán helyezkedik el, kilenc exonból álló 4378 bázispár hosszú kódoló génszakaszt 3' irányból egy 3522 bázispár, míg 5' oldalról egy 1531 bázispár hosszú nem kódoló génszakasz fogja közre. A CYP2D6 enzim 497 aminosavból tevődik össze (Kimura et al., 1989; Zhou et al., 2009).

5. táblázat: Főbb CYP2D6 szubsztrátok

<u>Szubsztrátok*</u>
Triciklusos antidepresszánsok: klomipramin, imipramin, doxepin, dezipramin, nortriptilin
Szelektív szerotonin visszavételt gátlók (SSRIs): fluoxetin, fluvoxamin, citalopram, sertralin, paroxetin
Nem triciklusos antidepresszánsok: atomoxetin, maprotilin, mianszerin, venlafaxin
Antipszichotikumok: klorpromazin, perfenazin, tioridazin, zotepin, zuklopentixol, mianszerin, olanzapin, risperidon, szertindol, haloperidol, aripriprazol
β-blokkolók: atenolol, bufuralol, karvedilol, metoprolol, bizoprolol, propranolol, bunitrolol, bupranolol, timolol, alprenol
Egyéb vérnyomás csökkentők: debrizoquin

Opioidok: kodein, dihidrokódein, tramadol
Antihisztaminok: terfenadin, oxatomid, loratadin, asztemizol, epinasztin, promethazin, mequitazin, azelasztin, difenhidramin, klorfeniramin
Szívritmus szabályzók: spartein, propafenon, enkainid, flekainid, cibenzolin, aprindin, mexiletin
Hányáscsillapítók: tropizetron, ondanzetron, dolazetron, metoklopramid
Köhögéscsillapítók: kodein, dextrometorfan
Szelektív ösztrogén receptor modulátorok: tamoxifen

*Zhou et al, 2009; Gardiner et al., 2006; Ingelman-Sundberg, 2005;

A CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 génhibák, valamint a CYP2D6*5 gén deléció és a CYP2D6 gén duplikáció

A legnagyobb mértékű genetikai polimorfizmust a CYP2D6-nál írták le, közülük ezen dolgozat keretében a fehér populációban előforduló öt legjelentősebbel (CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 génhiba, CYP2D6*5 génhiany és a CYP2D6 gén duplikáció) foglalkozom. A CYP2D6*3 mutáció egy adenin nukleotid deléciót jelent a 2594. helyen, ami a genetikai kód 'elcsúszását' (frameshift) eredményezi, és ennek következtében inaktív enzimfehérje expresszálódik. Hasonlóan a CYP2D6*6 mutáció egy timidin deléciót okoz az 1795. pozícióban, ami szintén a leolvasási keret eltolódását, és teljesen inaktív fehérje termelődését eredményezi (Zhou et al., 2009). A CYP2D6*3 és CYP2D6*6 mutációk allél gyakorisága a kaukázusi populációban viszonylag ritka (2 %, illetve 1 %) (2. táblázat). A CYP2D6*4 mutáció egy G>A cserét jelent az 1846. bázispárnál, ami egy 'splicing' rendellenességet és ezáltal egy korai stop kodont okoz. Következésképpen egy csonka és inaktív enzim (1. táblázat). A CYP2D6*4 génhiba allél gyakorisága a kaukázusi populációban viszonylag magas (12-21 %). A CYP2D6*5 génhiba a kódoló génszakasz teljes kivágódását eredményezi, ami a CYP2D6 enzim teljes hiányához vezet (Gaedigk et al., 1991). A teljes gén deléció gyakorisága 4-6 % a kaukázusi populációban (2. táblázat). A teljes génhiany mellett CYP2D6 gén duplikációt, vagy sokszorozódást is leírtak, ami az ultra-gyors metabolizáló fenotípus kialakulásáért felelős.

A felsorolt génhibák megléte alapján a betegek a gyenge, az átlagos, az extenzív és az ultra-gyors metabolizáló fenotípus csoportba sorolhatók be. Azon egyének, akik homozigóta mutáns genotípusúak a CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, vagy CYP2D6*6 génhibák tekintetében, illetve ha mindkét allélon jelen van a fenti mutációk valamelyike (nem expresszálódik róluk egyáltalán működőképes enzim), a gyenge metabolizáló fenotípusú

csoportba tartoznak. A heterozigóta egyének, akiknél csak az egyik allélról termelődik működőképes enzim, az átlagos metabolizálók közé, míg akiknél mindkét allélról expresszálódik működő képes CYP2D6 enzim, az extenzív metabolizáló fenotípusú csoportba tartoznak. Ultra-gyors metabolizálók azok a személyek, akiknél génszorzódás miatt kettőnél több CYP2D6 génről expresszálódik működőképes enzim fehérje. A dextrometorfan egy altató-kábítószer szintetikus analógja, a gyógyszer maga egy vény nélkül kapható köhögéscsillapító. Emberben a dextrometorfan vagy változatlan formában, vagy a dextrorfan alakjában ürül, ami egy farmakológiailag aktív metabolit (Dayer et al., 1989). Azért érdemes a dextrometorfant (O-demetiláció) megemlíteni, mert széles körben alkalmazzák próba szubsztrátként *in vivo* és *in vitro* CYP2D6 fenotípus, illetve enzim aktivitás vizsgálatoknál.

A CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 és CYP2D6*6 génhibák klinikai következményei

A CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 és CYP2D6*6 génhibák teljes aktivitásvesztést, vagy enzimhiányt (génhiány következtében) okoznak, ami a dextrometorfan metabolizmusán kívül számos egyéb gyógyszer lebontására is jelentős hatással vannak (5. táblázat).

Az összes triciklusos antidepresszáns egy dibenzapin (triciklusos) magot tartalmaz. A CYP2D6, illetve CYP2C19 enzimek intenzíven demetilezik a tercier amin triciklusos antidepresszánsokat szekunder aminokká. Mind a tercier, mind a szekunder aminok aktívak. A dezipramin imipraminból, míg a nortriptilin amitriptilinből keletkezik N-demetiláció útján, amelyet főként a CYP2D6 enzim katalizál, majd glukuronidálódnak (Breyer-Pfaff et al., 1997; Zhou et al., 2009). A triciklusos antidepresszánsok egy másik metabolikus útvonala (mind a szekunder, mind a tercier aminok esetében) a benzil-gyűrű hidroxilezése, amit szintén a CYP2D6 enzim végez. A CYP2D6 gyenge metabolizálók szekunder, vagy tercier aminokkal való egyszeri kezelése során az anyavegyület vérplazma AUC értéke 2-8-szorosa az átlagos metabolizáknál tapasztalhatóknak, sőt az aktív metabolitok is felhalmozódhatnak, mert továbbalakulásukért is a CYP2D6 enzim a felelős (Zhou et al., 2009). Így a gyenge metabolizálóknál már alacsonyabb dózissal is elérhető a terápiás hatás. A toxicitás veszélye igazán akkor áll fenn, ha a betegnél a CYP2D6 csökkent működése mellett a CYP2C19 is gyenge metabolizáló fenotípusként jelentkezik.

A legfontosabb szerotonin visszavételt gátló hatóanyagok a citalopram, a fluoxetin, a sertralin és a paroxetin (2.4.2. fejezet), metabolizmusukban főleg a CYP2D6 és a CYP2C19 enzimek, és kisebb mértékben a CYP2C9 és a CYP3A4 is részt vesz. A citalopram főleg N-

dezmethylcitaloprammá alakul (csak részleges CYP2D6 részvétellel), majd egy újabb demetilálódás után didezmetilcitalopram (főként a CYP2D6 katalizálja) képződik. A CYP2D6 enzim a citalopramot citalopram N-oxiddá is alakítja (Rao et al., 2007). A fluoxetin N-demetilézését a CYP2D6, CYP2C19 és CYP3A4 enzim végzi, majd a rákövetkező O-dealkilációt a CYP2C19 és CYP3A4 enzimek katalizálják (Margolis et al., 2000; Zhou et al., 2009). A paroxetin metiléndioxi csoportjának demetilézését főként a CYP2D6 enzim végzi (Bloomer et al., 1992). A szerotonin visszavételt gátlók előbb-utóbb telítik a CYP2D6 enzimet, ezért a telítési koncentráció elérése után a metabolizmust más CYP enzimek veszik át. A CYP2D6 gyenge metabolizálónál a CYP2D6 telítése már kisebb koncentrációnál bekövetkezik. Összegezve, a szerotonin visszavételt gátló gyógyszerek metabolizmusát nem kizárólag a CYP2D6 végzi, ezért a CYP2D6 genotípus ugyan befolyásolja a hatóanyagok inaktiválását, mégis a teljes eliminációban egyéb CYP enzimek is szerephez jutnak. Ultra-gyors metabolizálók bevonásával viszonylag kevés vizsgálat történt, azonban a gyorsabb gyógyszer kiürülés miatt szükség lehet a dózis emelésére a terápiás hatás eléréséhez.

A CYP2D6 szerepe ismeretes egyes, az antipszichotikumok közé tartozó gyógyszerhatóanyagok (klorpromazin, perfenazin, risperidon, aripiprazol) lebontásában (Urichuk et al., 2008; Swainston Harrison et al., 2004). A klorpromazin aktív 7-hidroxi metabolittá történő átalakítását elsősorban a CYP2D6 enzim végzi (Yoshii et al., 2000). A risperidon egy atípusos antipszichotikum, 9-hidroxi-risperidonná történő metabolizmusát főként a CYP2D6 és kisebb mértékben a CYP3A4 enzim katalizálja (Yasui-Furukori et al., 2001). A fő metabolit, a 9-hidroxi-risperidon farmakológiai aktivitása megegyezik az anyavegyületével, dopamin receptor affinitásuk hasonló. Mivel a 9-hidroxi metabolit aktivitása hasonló a risperidonhoz, a hatás szempontjából szignifikáns klinikai jelentősége nincs a CYP2D6 polimorfizmusnak. A perfenazin N-dezalkil perfenazinná, perfenazin szulfoxiddá és 7-hidroxi-perfenazinná történő átalakulását elsősorban a CYP2D6 enzim katalizálja, így a perfenazin metabolizmusának mértéke szoros összefüggésben van a CYP2D6 polimorfizmussal (Olesen et al., 2000; Zhou et al., 2009). Az aripiprazol egy atípusos antipszichotikum a felnőtt kori szkizofrénia kezelésére (Swainston Harrison et al., 2004). Fő metabolitja a dehidroaripiprazol, aminek szintén van affinitása a dopamin D2 receptorokhoz, farmakológiai aktivitása hasonló az anyavegyületéhez. A dehidroaripiprazol képződést elsősorban a CYP2D6 és CYP3A4 enzimek katalizálják. Számos klinikai tanulmány igazolta, hogy a CYP2D6 genotípus befolyásolja az aripiprazol 'clearance'-t (Zhou et al., 2009), de mivel a fő metabolit is rendelkezik farmakológiai hatással, általában nem volt szükség dózismódosításra a CYP2D6 gyenge metabolizáló betegeknél.

Elsősorban a CYP2D6 enzim katalizálja a β -adenoreceptor gátlók közé tartozó, bufuralol (Mautz et al., 1995), karvedilol (Oldham et al., 1997) és metoprolol metabolizmusát (Belpaire et al., 1998). Míg a bisoprolol metabolizmusában kisebb mértékben vesz részt a CYP2D6 (5. táblázat). *In vitro* vizsgálatokban a bufuralolt CYP2D6-szelektív próba szubsztrátként használják (Dayer et al., 1984; Gut et al., 1986; Zho et al., 2009), ugyanis fő metabolitja az 1'-hidroxibufuralol képződése a CYP2D6 enzim aktivitás jellemzésére alkalmas. A bufuralol - 1'-hidroxibufuralol átalakulás mértéke jelentősen alacsonyabb a CYP2D6 gyenge metabolizálóknál (Carcillo et al., 2003). A metoprolol egy kardio-szelektív β_1 -blokkoló, amit magas vérnyomás, angina pectoris és szívritmuszavar kezelésére használnak. A gyógyszer racemát formában van forgalomban, de az S-enantiomer β_1 adenoreceptorhoz való affinitása 500-szor magasabb, mint az R-enantiomeré. A metoprolol α -hidroxiláción (a beadott dózis 10 %-a), O-demetiláción (a beadott dózis 65 %-a) és N-demetiláción (a beadott dózis <10 %-a) megy keresztül (Zhou et al., 2009). Az α -hidroxilációt zömmel a CYP2D6 enzim katalizálja, míg az O-demetilációt a CYP2D6 és CYP3A4 enzimek is végzik (Johnson et al., 1996; Otton et al., 1988). Mindent egybevetve a CYP2D6 70-80 %-ban felelős a metoprolol metabolizmusáért. Egyszeri gyógyszer adagolás során 4-6-szor magasabb AUC értéket tapasztaltak a CYP2D6 gyenge metabolizálóknál (Hamelin et al., 2000; Zhou et al., 2009), míg ismételt adagolást követően 3-4-szer magasabb AUC volt jellemző a gyenge metabolizáló egyéneknél (Lennard et al., 1982). Ezzel szemben ultra-gyors metabolizálóknál csak 2-szeres dózis alkalmazásával érhető el az extenzív metabolizálóknál tapasztalt vér koncentráció (Kirchheiner et al., 2004). CYP2D6 gyenge metabolizálóknál a nem-kívánt mellékhatások kialakulásának kockázata 5-ször nagyobb, mint a többi fenotípus csoportnál (Wuttke et al., 2002). Bijl és mtsai (2009) egy nagy mintaszámú munkában (1533 beteg) megvizsgálták, hogy a CYP2D6*4 mutáns allél jelenléte mennyire befolyásolja a vérnyomást és a pulzust metoprolol kezelés alatt álló betegeknél. A CYP2D6*4/*4 homozigóta mutáns genotípusú egyéneknél nőtt a bradycardia előfordulásának veszélye a metoprolol kezelés hatására.

A szívritmust szabályzó gyógyszereket ion csatornákra gyakorolt hatásuk alapján szokták csoportosítani (Vaughan William-féle csoportosítás) (Zhou et al., 2009). Az I-es csoportba tartozik a spartein, cibenzolin, enkainid, flekainid, mexiletin, propafenon és aprindin. Az I-es csoport vegyületei nátrium csatornablokkolók. A II-es csoportba tartoznak a β -blokkolók (5. táblázat), amiket fentebb már tárgyaltunk részletesebben. A szívritmus szabályzó gyógyszerek III-as csoportjába tartoznak a különböző kálium ioncsatorna blokkolók, mint például az amiodaron, bretilium tozilat, bunaftin, ibutilid és sotalol. Végül a

IV-es csoport tagjai, a verapamil és a diltiazem (Sharma, 2007), kalcium csatorna blokkoló hatásúak. A szívritmust szabályzó gyógyszerekre általában szűk terápiás index jellemző és közvetlen kapcsolat van a farmakológiai aktivitásuk és a szabad plazma koncentráció között. Legtöbbjük intenzíven metabolizálódik és gyakorta farmakológiailag aktív metabolittá alakul (Mehvar et al., 2002; Zhou et al., 2009; Klotz, 2007). A CYP2D6 elsősorban az Ia (spartein: Ebner et al., 1995; és cibenzolin: Niwa et al., 2000), az Ib (aprindin: Ebner et al., 1993) és az Ic (propafenon: Botsch et al., 1993; Kroemer et al., 1991, valamint enkainid: Funck-Brentano et al., 1992; és flekainid: Zhou et al., 2009) csoportba tartozó szívritmust szabályzó gyógyszerek metabolizmusát katalizálja. A CYP2D6 polimorfizmus nagymértékben befolyásolja ezen vegyületek metabolizmusát, amely jelentősebb klinikai következményekkel is járhat.

2.4.4. CYP3A enzimek és a klinikai jelentőséggel bíró génhibáik

6. táblázat: Főbb CYP3A szubsztrátok

<u>Szubsztrátok*</u>
Antipszichotikumok: klonazepam, klozapin, haloperidol, olanzapin, aripriprazol, kvetiapin
Benzodiazepinek: midazolam, triazolam, alprazolam, estazolam, adinazolam
Antiepileptikumok: karbamazepin
Immunszuppresszánsok: ciklosporin A, takrolimusz, everolimusz, szirolimusz, mikofenolsav
Makrolid típusú antibiotikumok: eritromicin, klaritromicin
Sztatinok: atorvasztatin, rozuvasztatin
Vérnyomáscsökkentő: nifedipin

*Zhou et al, 2009

A CYP3A4-nek eddigi ismereteink szerint nincs klinikai jelentőséggel bíró génhibája, ezzel szemben a CYP3A5 polimorfizmusa jelentős. A máj teljes CYP3A enzim készletének zömét a CYP3A4, míg mindössze 7-8 %-át a CYP3A5 teszi ki (Zhou et al., 2008; Thompson et al., 2004). A CYP3A4 enzim nagyon sokféle, szerkezetileg igen eltérő vegyületet képes metabolizálni. Az enzim igen flexibilis, ezért jelentősen eltérő molekula tömegű vegyületeket is képes átalakítani a metyrapontól (226 dalton) kezdve a ciklosporinig (1203 dalton) (Zhou et al., 2008; Zhou et al., 2009). A 6. táblázatban a teljesség igénye nélkül feltüntettem néhány

jelentősebb CYP3A szubsztrátot. A CYP3A5 enzim szerkezete igen hasonló a CYP3A4-hez, ezért szubsztrát spektrumuk is jelentősen átfed.

A kaukázusi populációban a *CYP3A5* génhibák közül a *CYP3A5*3* mutáció a leggyakoribb, amelynek drasztikus következménye van, ugyanis a működőképes enzim teljes hiányát okozza. A *CYP3A5*3* mutáció egy A>G cserét jelent a *CYP3A5* gén 3. intron szakaszán. A génhiba egy splicing rendellenességet okoz, ami teljes enzimhiányt eredményez. Az európai fehér populációkban az egyének több mint 90 %-a mindkét allélon *CYP3A5*3* mutációt hordoz (2. táblázat), azaz az átlag európai emberben nem fejeződik ki a CYP3A5 enzim. A *CYP3A5*3* mutáció gyakorisága az afrikai-amerikai populációban 50 % körül van, míg az ázsiai populációban 70 %-os. Egyes feltevések szerint az evolúció során a CYP3A5 enzimre nem volt különösebb szükség, ezért egyre inkább elterjedhetett a *CYP3A5*3* génhiba. Ismeretes, hogy a CYP3A5 enzim elősegíti a só és víz visszatartást és ezzel biztosítja a megfelelő só-víz háztartást (Thompson et al., 2004). Az Egyenlítőhöz közel élő emberek (afrikai populáció) jobban ki vannak téve a napsugárzásnak és a melegnek, ezért lényegesebb a működőképes CYP3A5 enzim jelenléte, ami hozzájárul a megfelelő só-víz háztartás fenntartásához, ezáltal csökken a nem megfelelő só-víz visszatartás miatt fellépő magas vérnyomás kockázata (Thompson et al., 2004). A hidegebb éghajlaton erre kevésbé volt szükség, ezért az evolúció során az Egyenlítőtől távolabb lakó populációkban jobban elterjedhetett a *CYP3A5*3* mutáció.

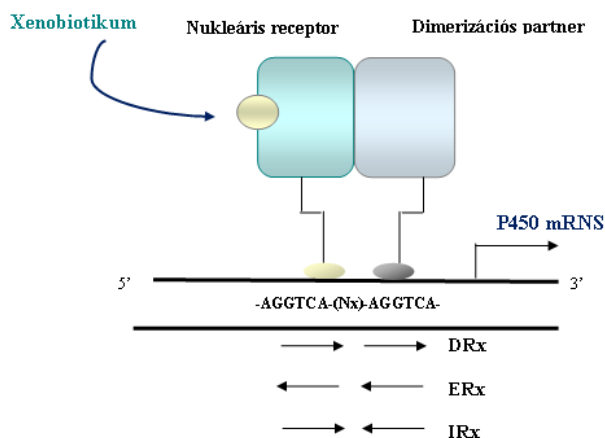
A CYP3A enzimek a legtöbb gyógyszer (6. táblázat), - beleértve az immunszuppresszáns gyógyszereket is (takrolimusz, ciklosporin A, everolimusz, sziirolimusz, mikofenolát), - metabolizmusában meghatározó szerepet töltenek be. Mivel a CYP3A4 és CYP3A5 enzimek szubsztrátjai nagymértékben megegyeznek, azon betegeknél, akiknél CYP3A5 enzim is aktívan jelen van, a CYP3A szubsztrátok gyorsabban metabolizálódnak, ami megkívánhatja a napi dózis megemelését (Zheng et al., 2003). Ez a takrolimusz metabolizmusra fokozottan jellemző, mert ismert, hogy a CYP3A5 enzim még intenzívebben alakítja át a takrolimuszt, mint a CYP3A4 (Dai et al., 2006).

2.5. A CYP enzim aktivitásra ható egyéb, nem genetikai faktorok jelentősége

A gyógyszeres terápia során több gyógyszer együttes alkalmazása mellett fellépő gyógyszer-kölcsönhatásoknak lehetnek farmakodinámiás és farmakokinetikai (metabolikus) okai. A metabolikus gyógyszer-interakciók hátterében a xenobiotikumok lebontásában szerepet játszó enzimek genetikai háttere (lásd előző fejezetek), indukciója vagy gátlása

(működésének csökkenése, vagy megszűnése) is állhat. A CYP enzimek kifejeződését külső (gyógyszeres kezelés, dohányzás, alkoholfogyasztás), illetve belső tényezők (nem, kor, hormonális állapot változás, betegségek) is befolyásolhatják.

Indukció hatására nő a CYP enzimek expressziójának mértéke, aminek következtében az enzimszint, illetve az enzim aktivitás is megnövekedik. Xenobiotikumok, vagy egyes endogén anyagok (hormonok, citokinek, interleukinek) hatására bekövetkező fokozott mRNS kifejeződés általában valamely nukleáris receptor aktivációjával jön létre (7. táblázat). A receptorok moduláris szerkezetűek, többféle kötőhelyet tartalmaznak: DNS-kötőhely, ligandkötőhely, ko-regulátor kötőhely. Az induktor közvetlenül vagy szignál transzdukcióval aktiválja a nukleáris receptort, amely a megfelelő dimerizációs partnerhez kapcsolódva (homo- vagy heterodimer képződés) kötődik az adott gén promóter régiójában lévő nukleáris receptor kötő helyre és az adott *CYP* gén transzkripcióját indukálja. A nukleáris receptor a *CYP* gén promóterében az ismétlődő AGGTCA szekvenciához kötődik. Az ismétlődő szekvenciákat 1-7 nukleotid választja el és irányultságát tekintve lehet egyirányú (direct repeat, DR), fordított (everted repeat, ER) és ellentétes (inverted repeat, IR) (Honkakosdi et al, 2000; Monostory et al., 2008) (2. ábra). A nukleáris receptorokon kívül számos más faktor (ko-represszor, ko-aktivátor, hiszton-acetiláz) is szükséges a transzkripcióhoz. Ezek funkciója eltérő lehet: módosíthatják a gén átíródását, teljes gátlást, illetve aktiválás fokozódást hozhatnak létre. A génszakaszra gyakorolt eredő hatás az induktor, a nukleáris receptor, a hozzá kapcsolódó dimerizációs partner, valamint a kofaktorok összhatásának a függvénye. Az eddig tárgyalt valódi indukcióval szemben létezik látszólagos indukció is, ahol a testidegen anyagok fokozhatják a CYP mRNS, vagy az enzimfehérje stabilitását is, amely ugyancsak a CYP enzim mennyiségi növekedéséhez vezet (Monostory et al., 2008). Az úgynevezett CYP indukciós válasz gyógyszerinterakciók következtében alakulhat ki. Az egyes gyógyszerek közötti kölcsönhatások befolyásolhatják a CYP-függő gyógyszer-metabolizmust, valamint hatással lehetnek a xenobiotikumok farmakokinetikai és toxikológiai viselkedésére. A gyógyszeres kezelés során megemelkedett CYP enzimszintek következtében az adott gyógyszer metabolizmusa fokozódik, emiatt előfordulhat, hogy vérszintje nem éri el a terápiás koncentrációt, így a gyógyszerhatás elmaradhat. Ilyen esetekben az adott gyógyszer dózisát módosítani kell, a vérszint időszakonkénti monitorozása pedig segíthet a megfelelő dózis beállításában. Az enzimindukció általában késleltetett hatású, dózis-függő és az indukciós hatás is lassan szűnik meg az induktor vegyület eliminációja után (Handschin et al., 2003).



2. ábra: A CYP enzimek szabályozásának sematikus ábrája (Monostory et al., 2008)

A *CYP1A* gének esetében a reguláló szakaszok négy csoportba oszthatóak (Fujisawa-Sehara et al, 1987): a BTE (basic transcription element) az alap aktivitásért felelős szakasz; az XRE (xenobiotic responsive element) az indukciós hatásért felelős szekvencia; az NRE (negative regulatory element) a negatív hatásért felelős szakasz; a GRE (glucocorticoid responsive element) az indukciós hatás módosításáért felelős génszakasz. A *CYP1A1* gén számos pozitív (enhancer) és negatív (silencer) szabályozó elemet tartalmaz. A *CYP1A1* indukciója elsősorban az aromás szénhidrogén receptor (AhR) aktiválásával történik. Induktor hiányában (alap állapotban) az AhR számos fehérjével asszociálódva (Hsp90-hősokk fehérje, XAP2: hepatitis B vírus X-associated protein, p23) a citoszolban található. Az induktor (3-metilkolantrén; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) a receptorhoz kötődik, majd a citoszolikus AhR komplex disszociál, és a receptor belép a sejtmagba. A magban az AhR-induktor komplex heterodimert képez az AhR nukleáris transzlokátorral (Arnt), amely elszállítja a *CYP1A1* gén promóterében lévő XRE szakaszhoz és ezáltal beindítja, illetve fokozza a *CYP1A1* gén transzkripcióját (Reyes et al., 1992; Matsushita et al., 1993; Tamási et al., 2003). Az enzim mennyiségének végtelenségig történő fokozódását azonban egy negatív visszacsatolás megakadályozza, mert a *CYP1A1* enzim megjelenése aktiválja az AhR receptor represszort (AhRR), ami az Arnt-al heterodimert képezve megakadályozza a gén további transzkripcióját (Baba et al., 2001; Tamási et al., 2003).

A *CYP2B6* indukciója elsődlegesen a CAR (constitutive androstan receptor) nukleáris receptoron keresztül történik. Az induktor (pl. fenobarbitál) közvetlenül nem kötődik a CAR-hoz, hanem foszforilációs kaszkád mechanizmussal egyrészt aktiválódik, másrészt belép a sejtmagba. Ezen kívül a szabályzás történhet a PXR-on (pregnán X receptor), és a VDR-on (D-vitamin receptor) keresztül is. Az aktivált CAR, PXR, vagy VDR receptorok heterodimert

képeznek az RXR-al (retinoid X receptor), és a promóter génszakaszon található aktiváló (enhancer) régióhoz a PBRU-hoz (Phenobarbital-Responsive Enhancer Unit) kötődnek és ezzel fokozzák a *CYP2B6* gén átírását. A glukokortikoidok közvetett úton szintén fokozzák a *CYP2B6* expressziót (Tamási et al., 2003; Pascussi et al., 2000).

A *CYP2C9* és *CYP2C19* gént számos olyan vegyület indukálja, amely egyben induktora a *CYP2B6* és *CYP3A* enzimeknek is (fenobarbitál, dexametazon, rifampicin). A *CYP2C9* és *CYP2C19* indukcióját legalább három receptor közvetíti: GR (Glucocorticoid receptor), PXR és CAR. A *CYP2C* gének promóter régiójában két aktiváló szakasz, a GRE (glucocorticoid responsive element) és a CAR érzékeny szakasz található, amelyet egyrészt a GR/GR homodimer, másrészt a CAR/RXR és a PXR/RXR heterodimerek hoznak működésbe. E két aktiváló szakasz jelenléte a glukokortikoidok és a testidegen anyagok által kiváltott komplex szabályzást jelenti (Gerbal-Chaloin et al., 2001; Gerbal-Chaloin et al., 2002; Monostory et al., 2008; Tamási et al., 2003).

A *CYP3A* gén legfontosabb szabályozó szakasza a gén promóterében lévő PXRE (PXR responsive element), amelyhez kötődő induktor-PXR/RXR komplex váltja ki a *CYP3A* indukciót. A maximális indukcióhoz azonban szükséges az XREM (Xenobiotic Responsive Element) szakasz aktivációja is. Az induktor-PXR/RXR komplex a PXRE szakaszon kívül az XREM szakaszhoz is képes kötődni. Ezen felül az aktiválódó CAR/RXR komplex is képes a *CYP3A4* indukcióra, bár a fő indukciós útvonal az aktivált PXR/RXR receptor komplexen keresztül történik (Pascussi et al., 2000; Pascussi et al., 2001, Tamási et al., 2003). Az indukció a glukokortikoid receptoron keresztül is megvalósulhat, a GR homodimert képez, és a GRE szakaszhoz kötődik. A glukokortikoidok (pl. dexametazon) kis koncentrációban (0,1 μM) a GR-on keresztül fejtik ki hatásukat, nagyobb koncentrációban (1 μM) azonban a PXR-t is aktiválják. Ehhez járul még hozzá, hogy a dexametazon szubmikromolos koncentrációban az RXR és a PXR expresszióját is fokozza a GR-on keresztül (Pascussi et al., 2000; Pascussi et al., 2001). Végül indukció megvalósulhat a VDR aktiválása során képződött VDR/RXR heterodimeren keresztül is (Tamási et al., 2003).

7. táblázat: Az egyes CYP enzimek indukciójában résztvevő nukleáris receptorok

CYP enzimek	Nukleáris receptorok
CYP1A1/2	AhR
CYP2B6	CAR, PXR
CYP2C9	GR, PXR, CAR
CYP2C19	GR, PXR, CAR
CYP3A4/5	GR, PXR, CAR, VDR

A gyógyszer-interakciók másik része az adott hatóanyag metabolizmusában résztvevő CYP enzim működésének gátlására vezethető vissza. Az enzimgátlás lehet reverzibilis (kompetitív és nem kompetitív), valamint irreverzibilis. A kompetitív reverzibilis gátlás esetében a gátló anyag a szubsztrát enzimhez való kötődését akadályozza meg, ilyenkor a szubsztrát és az inhibitor között versengés jön létre az enzimért (leggyakrabban az enzim aktív helyéért). A kompetitív inhibitor csökkenti az enzim-szubsztrát komplex kialakulását az adott szubsztrát koncentrációnál. A nem kompetitív reverzibilis gátlásnál a gátló anyag nem az enzim aktív centrumához, hanem valamely a katalízisben szerepet játszó csoporthoz kötődik, vagy egyéb módon akadályozza meg az enzim katalízist. Az irreverzibilis, vagy mechanizmus alapú gátlás során a gátlószer a gátló hatását enzimátikus átalakítás után nyeri el. Az inhibitor az enzim szubsztrát-kötő zsebéhez kötődik, ezt követően átalakul, és a metabolitja fejt ki a gátlóhatást.

A káros gyógyszer-kölcsönhatások elkerüléséhez a genetikai háttér mellett (lásd előző fejezetek) ismerni kell a CYP enzimek szerepét a gyógyszer hatóanyagok metabolizmusában (3-6. táblázat), a CYP enzimek induktorait, illetve inhibitorait (8. táblázat). A gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP enzimek azonosításával, a gyógyszer-kölcsönhatások feltárásával számos mellékhatás kiküszöbölhető.

8. táblázat: A gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimek szelektív inhibitorai és induktorai

CYP enzim	Inhibitorok	Indukáló ágensek
CYP1A2	α -naftoflavon, furafillin	3-metilkolantren, β - naftoflavon
CYP2B6	tiotepa	rifampicin, fenobarbitál

CYP2C9	szulfafenazol	rifampicin, fenobarbitál, dexametazon
CYP2C19	tranilcipromin, ticlopidin, omeprazol	rifampicin, fenobarbitál, dexametazon
CYP2D6	fluoxetin, kinidin	nem indukálható
CYP3A4	ketokonazol	rifampicin, fenobarbitál, dexametazon
CYP3A5	ketokonazol	rifampicin, fenobarbitál, dexametazon

2.6. A gyógyszer-lebontó képesség meghatározása

A gyógyszer lebontó képesség több szinten vizsgálható: i) a gyógyszer normalizált vérkoncentrációjának (gyógyszer vérszint / dózis * testsúly), ii) az egyes CYP enzimek specifikus aktivitásának, iii) a CYP expresszió mértékének meghatározásával, iv) illetve a CYP génhibák azonosításával. Bizonyos esetekben (pl. szűk terápiás tartományú gyógyszerek alkalmazása során) a gyógyszer beadása után az idő függvényében mérik a vérkoncentrációt és meghatározzák az AUC, vagy clearance értékeket. Gyenge metabolizálók esetében az adott gyógyszer AUC értéke nagyobb, míg clearance értéke kisebb, mint az átlagos metabolizáló fenotípusú egyének esetében. Az extenzív, vagy ultra-gyors metabolizáló fenotípusú csoportoknál kisebb AUC, illetve nagyobb clearance értékek a jellemzőek. Ismételt gyógyszer bevételt követően kialakult steady state állapotban végzett méréseknél kisebbek lehetnek a különbségek az AUC, illetve clearance értékek között a különböző fenotípusú csoportokban (Zhou et al., 2009). A módszer hátránya, hogy rendkívül időigényes és költséges.

A szervezet gyógyszer-metabolizáló kapacitása bizonyos egyszerűsítések után becsülhető. A máj gyógyszer-lebontó képességéből következtethetünk a szervezet gyógyszer-metabolizáló kapacitására, mivel a gyógyszer-metabolizmus elsősorban a májban zajlik, és csak kisebb mértékben más szervekben, szövetekben (bél, vese, agy). A máj gyógyszer-metabolizáló képességét elsődlegesen a CYP enzimek mennyisége és aktivitása határozza meg. A gyógyszer-metabolizmusban legjelentősebb CYP enzimek a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4/5. Az *in vitro* CYP enzimaktivitás vizsgálatokat CYP szelektív szubsztrátok metabolizmusának meghatározásával végzik. CYP szelektív szubsztrátok alkalmazásával máj mikroszóma frakcióban meghatározható az adott enzim aktivitása, ami

közvetlen információt nyújt az adott egyén gyógyszer-lebontó kapacitásáról. A módszer hátránya, hogy nagy mennyiségű májszövetre van szükség a megfelelő mennyiségű mikroszóma frakció kinyeréséhez. A metodika tehát a klinikumban nem alkalmazható a gyógyszer-metabolizáló kapacitás meghatározására.

A gyógyszer-lebontó képesség meghatározására ideálisabb módszernek tűnik a gén expressziós vizsgálatok kombinációja farmakogenetikai vizsgálatokkal. A farmakogenetikai vizsgálatok során a genomiális DNS-ből kimutathatók a klinikai jelentőséggel bíró CYP génhibák (2.4. fejezet). A farmakogenetikai vizsgálatok metodikailag egyszerűek, érzékenyek, és óriási előnyük, hogy elvégezhetőek a perifériás vérből. Farmakogenetikai vizsgálatokat elegendő egyszer egy életben elvégezni, hiszen a DNS-ben található génhibák változatlanok. A DNS-mutációk meghatározása azonban csak egy előzetes becslést ad az egyének gyógyszer-metabolizáló kapacitásával kapcsolatban. Ugyanis a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP gének kifejeződését külső és belső tényezők befolyásolhatják. A CYP gén expresszió és enzim aktivitás mértéke időről-időre változhat, így szükségessé válhat a vizsgálatok ismételt elvégzése.

A máj gyógyszer-lebontó képességét jellemző CYP enzimaktivitásokra következtethetünk a májban levő relatív mRNS mennyiségéből abban az esetben, ha a hepatikus CYP enzimaktivitás és a májban mérhető CYP mRNS szintek között szoros korreláció van. A CYP génexpressziós vizsgálatok kvantitatív RT-PCR (real-time PCR) technikával történnek, ami egy rendkívül érzékeny módszer, lényegesen kisebb a szövetigénye, mint a CYP enzimaktivitás méréseknek. A máj CYP mRNS szintek már egy tübiopsziával nyert szövetből is könnyen meghatározhatók. A máj biopszia vétel azonban kockázatos, ezért a gyógyszer lebontó kapacitás meghatározására még kedvezőbb módszer lehetne, ha a vér, vagy a fehérvérsejtek relatív mRNS szintje tükrözné a máj CYP enzimaktivitásait. Ugyanis egy egyszerű vérvétel után a CYP mRNS szintek alapján nyerhetünk információt a máj gyógyszer-lebontó képességéről. Az irodalomban több próbálkozás is történt, azonban nem találtak szoros összefüggéseket a májban levő CYP enzim aktivitás, és a perifériás vérben levő CYP mRNS mennyiségek között (Finnström et al., 2001; Nowakowski et al., 2002; Koch et al., 2002; Furukawa et al., 2004; Lee et al., 2010).

3. Célkitűzések

A jelen munka célja egy többlépcsős diagnosztikai rendszer kialakítása volt a CYP-fenotipizálás, illetve a CYP-genotipizálás kombinálásával, amivel teljesebb képet kaphatunk egy beteg gyógyszer-metabolizáló képességéről.

- A gyógyszer-metabolizáló képesség jellemzésére alkalmas diagnosztikai rendszer egyfelől a DNS analízissel megállapítható génhibák kimutatásán alapul (CYP-genotipizálás). A gyógyszer-metabolizmus szempontjából jelentős CYP enzimek (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5) génjeiben olyan mutációk kimutatására koncentráltunk, amelyek csökkent működő képességű, vagy teljesen inaktív enzimet eredményeznek, illetve teljes enzimhiányt okoznak és a kaukázusi (fehér) populációban viszonylag gyakran előfordulnak (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP3A5*3).
- Mivel a CYP enzimek aktivitása és expressziója időről-időre változhat, az aktuális gyógyszer-lebontó képesség meghatározását céloztuk meg olyan esetekben is, amikor CYP génhiba nem volt kimutatható a betegeknél (CYP-fenotipizálás). Ezért a gyógyszer-metabolizmus szempontjából fontos CYP enzimek (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4) aktivitását és expresszióját is meghatároztuk.
- Az aktuális gyógyszer-metabolizáló képesség becslésére leginkább alkalmas CYP enzimaktivitás mérések májszöveten elvégezhetőek, azonban célunk volt a klinikumban is rutinszerűen alkalmazható módszer kidolgozása. Első lépcsőben összevetettük a májban mérhető specifikus CYP enzimaktivitás értékeket a máj CYP mRNS szintjeivel. A CYP expresszió meghatározásához szükséges májszövet tűbiopsziával nyerhető, azonban a mintavétel bonyolult és kockázatos, ezért lényeges, hogy a máj gyógyszer-lebontó kapacitását könnyebben hozzáférhető mintából, pl. perifériás vérből is meg tudjuk határozni. A CYP expresszió meghatározására a vér alakos elemei közül a leukociták a legalkalmasabbak, mert az érett vörösvértestekben már nincs jelen a sejtmag, vagyis a különböző gének mRNS szintje legjobb esetben is csak a sejtmag kilökődése előtti állapotot mutatja. Összevetettük a fehérvérsejtekben levő CYP expresszió mértékét a máj specifikus CYP enzimaktivásaival.

- A kaukázusi (fehér) populációhoz tartozó magyarországi donoroknál meghatároztuk a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimaktivitásokat és megvizsgáltuk az egyes CYP aktivitások gyakorisági eloszlását. Majd a májban mérhető CYP aktivitások és a májban, illetve fehérvérsejtekben meghatározható CYP mRNS szintek összevetésére korrelációs analízist végeztünk.
- A CYP-genotipizálás és CYP-fenotipizálás eredményeinek együttes értékelésével meghatároztuk a májdonorok gyógyszer-lebontó képességét gyenge, átlagos, vagy extenzív metabolizáló fenotípusú csoportba sorolva őket. Az egyes csoportok közti határértékek alapján a betegek gyógyszer-lebontó képessége is minősíthető.
- További célunk a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő egyes CYP enzimek allél és genotípus, valamint fenotípus gyakoriságainak meghatározása és a genotipizálás során kapott allél gyakoriságok összevetése az irodalomban leírt, kaukázusi (fehér) populációkra vonatkozó adatokkal. Az elemzést májdonorok, illetve betegek vérmintáiból végeztük el.
- A CYP génhibák meghatározására szolgáló módszerek megbízhatósága mellett a költségminimalizálásra is törekedtünk. A költségesebb hidrolízis SNP (Single Nucleotide Polimorphism) analízist összevetettük a költséghatékonyabb HRM (High Resolution Melting Curve) analízissel.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A dolgozatban felhasznált vegyszerek, reagensek

A fenacetin, a marha szérum albumin, a molekuláris biológiai tisztaságú kálium-hidrogén karbonát és ammónium klorid, a dinátrium-hidrogén foszfát, a mefenitoin, a nifedipin, a midazolam, valamint a tolbutamid és a dextrometorfan a Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től (Steinheim, Németország) származtak. Az acetonitril, az ammónium-acetát, az etanol, a Folin-Ciocalteu's fenol reagens, az izopropanol, a kálium-klorid, a nátrium-klorid, a kálium-dihidrogén-foszfát, a nátrium-hidroxid, a kloroform, a magnézium-klorid, a metanol, a nátrium-karbonát, a nátrium-acetát, a nátrium-perklorát és a dietil pirokarbonát (DEPC), a glükóz 6-foszfát és a glükóz 6-foszfát dehidrogenáz Merck (Darmstadt, Németország) termék volt. A jégecetet, a kálium-hidrogén foszfátot, a kálium-hidroxidot, a NADPH-t, a TRIS (2-amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol)-t, a sósavat és az EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) a Reanal-tól (Budapest) vásároltuk. Minden egyéb reagens a Mercktől és a Reanal-tól származott.

4.2. Májszövet, illetve vérminták

Munkánk során 164 szervdonor vér és máj mintáját használtuk fel vizsgálatainkhoz, a minták a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikájáról (Budapest) származtak. 146 donor mája nem került beültetésre, 18 esetben a máj egy része beültetésre került, a maradék szegmentet használtuk fel kísérleteinkhez. A májszövet donorok demográfiai adatai: férfi/nő arány 91/73, életkor 3-tól 74 évig terjedt ($43,4 \pm 14,46$ év) és a halál oka rendszerint koponyaúri vérzés (65,2 %), illetve agyvelői zúzódás volt (34,8 %). A májszövetet olyan hemodinamikailag stabil agyhalottakból távolították el, akik még normális májfunkciós paraméterekkel rendelkeztek. A máj- és vérminták hűtve érkeztek laboratóriumunkba. Az MTA Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Laboratóriuma rendelkezik a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével humán vér és májszövet tudományos célból történő felhasználásához.

A betegek vérmintáit együttműködési megállapodás alapján az alábbi kórházaktól kaptuk:

- Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinika (vesetranszplantált betegek)
- Szent László Kórház, Csontvelő Transzplantációs Osztály (leukémiás gyermekek)

- Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinika (szkizofrén és egyéb pszichózisban szenvedő betegek)
- Heim Pál Gyermekkorház Madarász utcai Kórháza (epilepsziás betegek)
- Fejér Megyei Szent György Kórház Székesfehérvár (májkárosodásban szenvedő betegek)
- Semmelweis Egyetem, II. Gyermekklinika (daganatos betegségekben szenvedő gyermekek)
- Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézet (szívtranszplantált gyermekek)

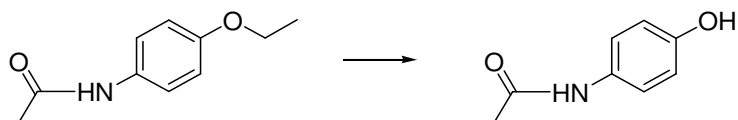
4.3. A mikroszóma preparálás menete

A specifikus CYP enzimaktivitás vizsgálatokat kadaver humán májszövetből preparált mikroszóma frakcióval végeztük. A kadaver humán májszövetet (kb. 20 g) 154 mM KCl-ot és 1 mM EDTA-t tartalmazó 0,1 M Tris-HCl (pH=7,4) pufferben homogenizáltuk. A homogenizátumot 4°C-on 30 percig 10.000xg-vel centrifugáltuk. A felülúszóból (S9 frakció) ultracentrifugálással nyerhető ki a mikroszóma frakció (van der Hoeven et al., 1974). Az S9 frakciót 105.000xg-vel egy óráig centrifugáltuk, majd a felülúszót (citoplazma fázis) eltávolítottuk, és a mikroszómát tartalmazó csapadékot mostuk (pufferben szuszpendáltuk és még egy óráig centrifugáltuk 105.000xg-vel). A centrifugálást követően a csapadékokat összegyűjtöttük, szuszpenziót készítettünk és -80°C-on tároltuk. A máj mikroszóma frakció teljes fehérje tartalmát a *Lowry és mtsai* (1951) által leírt módszerrel határoztuk meg.

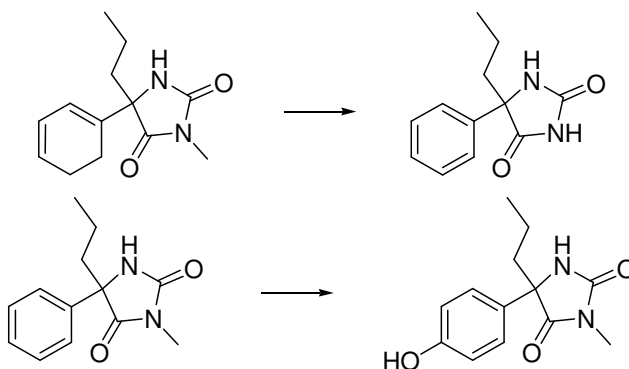
4.4. Specifikus CYP enzimaktivitás meghatározás

A specifikus enzimaktivitás mérések során a következő, irodalomból ismert módszereket alkalmaztuk: CYP1A2 - fenacetin O-deetilézés (Butler et al., 1989); CYP2B6 - mefenitoin N-demetilézés (Heyn et al., 1996); CYP2C9 - tolbutamid 4-hidroxilezés (Miners et al., 1996); CYP2C19 - mefenitoin 4'-hidroxilezés (Srivastava et al., 1991); CYP2D6 - dextrometorphan O-demetilézés (Kronbach et al., 1987); CYP3A4/5 - midazolam 1'- és 4-hidroxilezés (Kronbach et al., 1989) és nifedipin oxidálás (Guengerich et al., 1986) (3-8. ábra). Az inkubációs elegy összetétele: NADPH-generáló rendszer (1 mM NADPH, 5 mM MgCl₂, 10 mM glükóz 6-foszfát, 2 egység /ml glükóz 6-foszfát-dehidrogenáz), humán máj mikroszóma, valamint a különböző CYP szelektív szubsztrátok. Az inkubálást 37°C-on, 0,1 M TRIS-HCl pufferben (pH=7,4) végeztük, kivéve a midazolam 1'- és 4-hidroxilezést,

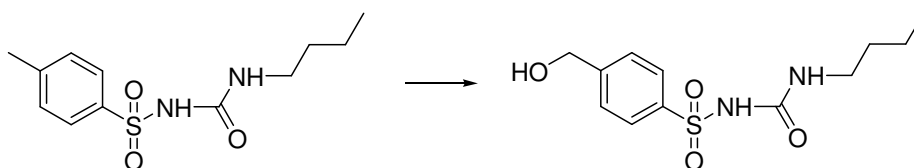
valamint a nifedipin oxidálást, melynek során 100 mM-os foszfát puffert (pH=7,4) alkalmaztunk. Az enzimreakciót jéghideg metanollal állítottuk le és a képződött metabolitok mennyiségét HPLC-UV (ELITE, LaChrom, Merck), vagy HPLC-MS (Perkin Elmer Series 200 micro LC/AB Sciex 3200 QTRAP (Merck, Darmstadt, Németország) detektálással határoztuk meg (9-12. táblázat).



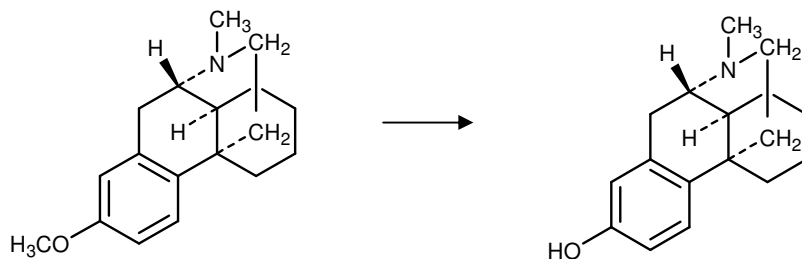
3. ábra: A CYP1A2 enzim által katalizált fenacetin O-deetiláz reakció



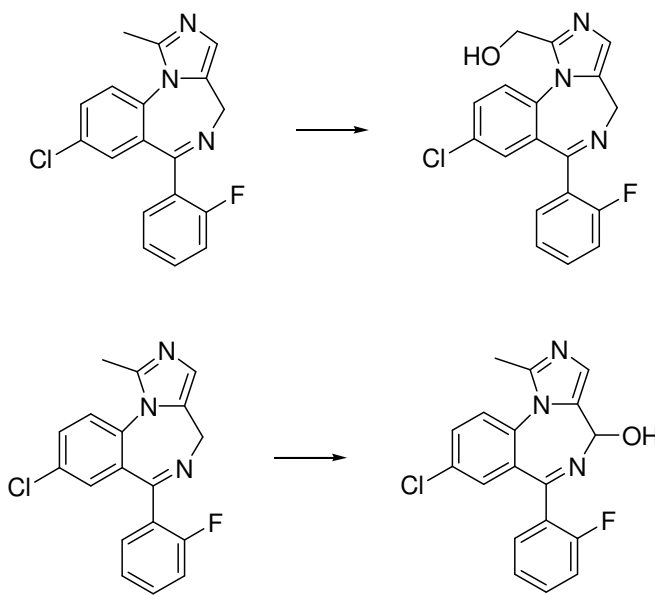
4. ábra: A CYP2B6 (mefenitoin N-demetiláz) és a CYP2C19 (mefenitoin 4'-hidroxiláz) enzim által katalizált reakciók



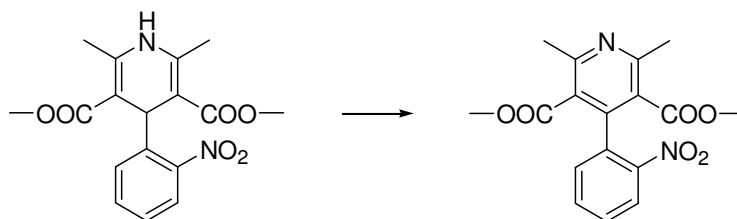
5. ábra: A CYP2C9 enzim által katalizált tolbutamid 4-hidroxiláz reakció



6. ábra: A CYP2D6 enzim által katalizált dextrometorfan O-demetiláz reakció



7. ábra: A CYP3A4/5 enzimek által katalizált reakciók: midazolam 1'- és 4-hidroxilezés



8. ábra: A CYP3A4/5 enzimek által katalizált nifedipin oxidáz reakció

9. táblázat: A specifikus CYP enzim reakciók körülményei

CYP enzim	Szelektív szubsztrát	Szubsztrát koncentráció	Mikroszóma	Inkubálási idő
CYP1A2	fenacetin	0,4 mM	2 mg/ml	10 perc
CYP2B6/CYP2C19	mefenitoin	1 mM	1 mg/ml	20 perc
CYP2C9	tolbutamid	1 mM	1 mg/ml	30 perc
CYP2D6	dextrometorfan	2 mM	1,6 mg/ml	20 perc
CYP3A4/5	midazolam	0,4 mM	0,8 mg/ml	10 perc
CYP3A4/5	nifedipin	0,4 mM	0,8 mg/ml	10 perc

10. táblázat: A HPLC-UVmérések körülményei

CYP enzim	Katalizált reakció	Eluens összetétele	Detektálási hullámhossz
CYP1A2	fenacetin O-deetilezés	acetonitril: 20 mM ammónium-acetát (pH=6,0)=1:9 (v/v)	245 nm
CYP2C9	tolbutamid 4-hidroxlézés	acetonitril: 10 mM nátrium-acetát (pH=4,4)=3:7 (v/v)	230 nm
CYP2D6	dextrometorfan O-demetilezés	acetonitril: 150 mM nátrium perklorát (pH=2,0)=3:7 (v/v)	200 nm
CYP3A4/5	midazolam 4-, és 1'-hidroxilezés	acetonitril: 50 mM KH ₂ PO ₄ puffer (pH=7,2)=4:6 (v/v)	218 nm

Az oszlop típusa minden esetben: LiChrosper 100 RP-18, 5 µm, 125x4 mm (Merck) volt.

11. táblázat: A HPLC-MS mérések kromatográfiás körülményei

CYP enzim	Katalizált reakció	Eluens összetétele
CYP2B6/CYP2C19	mefenitoin N-demetiláció/ mefenitoin 4'-hidroxiláció	acetonitril: 10 mM NH ₄ -acetát
CYP3A4/5	nifedipin oxidálás	acetonitril: 10 mM NH ₄ -acetát

Az oszlop típusa mindkét esetben: Purospher STAR RP-18 endcapped (3 µm), 55x2 mm (Merck) volt.

12. táblázat: A HPLC-MS mérések tömegspektrometriás körülményei

CYP enzim	MS mód	MRM átmenetek (m/z)
CYP2B6/CYP2C19	pozitív ESI	mephenitoin: 219/134 (23 eV)
	MS-MS (MRM)	4-hidroxi mephenitoin:235/150 (25 eV) nirvanol: 205/134 (23 eV)
CYP3A4/5	pozitív ESI	nifedipin: 347/254 (25 eV)
	MS-MS (MRM)	oxidált nifedipin:345/284 (37 eV)

A belső standard mindkét esetben a fenacetin (180/110 25eV ütközési energiánál) volt.

4.5. Leukocita izolálás teljes vérből

Az 500 µl véralvadás gátlóval (EDTA) kezelt vérmintához 1 ml vörösvértest lízis puffert adtunk (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), majd összekeverés után centrifugáltuk. A centrifugálást 780xg-n, 5percig, szobahőmérsékleten végeztük. A felülúszó eltávolítása után a fehérvérsejtek az eppendorf cső alján fehér csapadék formájában láthatók. A csapadékhoz ismételen 1 ml vörösvértest lízis puffert adtunk, összekeverés után újra centrifugáltuk.

4.6. DNS izolálás leukocitákból

A fehérvérsejteket 200 µl PBS-ben (Phosphate Buffered Saline: 2,68 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 136,7 mM NaCl és 8,1 mM Na₂HPO₄; pH=6,5-7) szuszpendáltuk. A DNS izolálás a High Pure Template Preparation Kit-tel (Roche Diagnostics) történt a gyártó által megadott utasítások alapján. A nukleázok inaktiválása proteináz K-val történt. A DNS koncentrációjának meghatározását és tisztaságának ellenőrzését NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington DE) végeztük.

4.7. RNS izolálás

Minden egyes donor májzsövetéből és fehérvérsejtjeiből RNS-t izoláltunk. A betegek vizsgálata során a fehérvérsejtekből történt az RNS izolálás. A májzsövetet (10 mg) homogenizáltuk és 1 ml Trizol reagenst (Invitrogen, Carlsbad, CA) adtunk hozzá. A fehérvérsejt mintákhoz (10⁷ leukocitához) szintén 1 ml Trizol reagenst adtunk. Az RNS izolálást a gyártó által megadottak szerint végeztük. A mintákhoz 200 µl kloroformot adtunk,

összekevertük és az egyes fázisokat centrifugálással (10.000xg, 15 perc) választottuk szét. A kialakult három fázis közül a felső vizes fázist, amely az RNS-t tartalmazta, külön választottuk és 0,5 ml i-propanollal kicsaptuk az RNS-t. Az RNS precipitációja a minták fagyasztásával (szárzjégben) segíthető elő. A kicsapódott RNS-t centrifugáltuk (10.000xg, 10 perc), majd 75% etanollal kétszer mostuk, végül eltávolítottuk az etanolt és megszáritottuk az RNS mintákat. Az RNS-t 0,01% DEPC-el kezelt vízben oldottuk. Az RNS koncentrációjának meghatározását és tisztaságának ellenőrzését szintén NanoDrop 1000 spektrofotométerrel végeztük el.

4.8. Reverz transzkripció

Az RNS preparátumok reverz transzkripcióját iScript cDNA Synthesis Kit-tel (BioRad Laboratories, Hercules CA) végeztük a gyártó által megadott utasítások alapján. 1 µg RNS reverz transzkripciójának hőmérséklet protokollja: 25°C 5 perc, 42°C 30 perc, 85°C 5 perc.

4.9. PCR (Polimerase Chain Reaction) TaqMan próbákkal

A PCR mérések során a vizsgálni kívánt DNS szakasz 5' és 3' végére tervezett primer párt, TaqMan próbákat és úgynevezett MasterMix-eket használtunk, amely tartalmazza a Taq DNS polimerázt, az enzim működéséhez szükséges MgCl₂-t, és a dNTP-kat (dezoxiribonukleozid trifoszfátokat). A TaqMan próba egy duplán jelölt oligonukleotid, 5' végén egy fluoreszcens festék (riporter vegyület), a 3' végén pedig egy kioltó molekula (quencher) található. Az oligonukleotid bázis-szekvenciája a vizsgálni kívánt DNS-szakasz egy részével komplementer. Az oligonukleotid próba két végén lévő két festék közel van egymáshoz, így megvilágításkor a két molekula között energia-átadás történik (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer), vagyis a kioltó molekula elnyeli a fluoreszcens festék energiáját. Az amplifikáció során a DNS polimeráz 5'-3' irányú exonukleáz aktivitása elbontja a próbát, így a fluoreszcens festék eltávolodik a quencher molekulától, és az UV fényvel gerjesztett fluoreszcens festék látható fényt emittál. A fluoreszcens jel arányos a felszaporított PCR termékkel.

4.9.1. CYP mRNS mennyiség meghatározása kvantitatív real-time PCR-el

A májszövetben, illetve a fehérvérsejtekben lévő CYP mRNS szintek mennyiségi meghatározása során nem abszolút, hanem relatív mennyiségeket állapítottunk meg. Az egyes

CYP mRNS szinteket a glicerinaldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) mRNS mennyiségéhez viszonyítottuk. A GAPDH egy úgynevezett 'housekeeping' gén, expressziója állandó, nem változik különböző hatásokra (pl. gyógyszeres kezelés, hormonális változás).

A májszövet és fehérvérsejt mintákból izolált RNS-t cDNS-sé alakítottuk (4.8. fejezet). A cDNS mintákból GAPDH, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 mRNS mennyiségeket határoztunk meg. A primereket két egymást követő exonra terveztük, hogy esetlegesen az RNS mintában szennyezőként jelen lévő genomiális DNS ne zavarja a meghatározást. A primereket a Biosearch Technologies (Novato CA, USA) szintetizálta, az UPL (universal probe library) próbák a Roche Diagnostics-tól származtak (primer és próba szekvenciák a 13. táblázatban találhatóak). A PCR reakcióhoz Light Cycler 480 Probes Master-t (Roche Diagnostics) használtunk, a reakció elegy 200-200 nM primert (forward és reverse), 100 nM FAM-jelölt próbát és 500 ng/ml cDNS-t tartalmazott. A PCR reakció hőmérséklet protokollja: 95^oC-on 10 percig történő enzimaktiválás után 50 ciklus (95^oC 10 sec denaturáció, 60^oC 30 sec lánchosszabbítás) következett.

13. táblázat: A CYP mRNS mennyiségek meghatározásához felhasznált primer és próba szekvenciák.

CYP enzim	Primer szekvenciák		Jelölt próba szekvenciák
CYP1A2	forward	5'-ACAACCCTGCCAATCTCAAG-3'	FAM-5'- CTGCCTCT-3'- BHQ1
	reverse	5'-GGGAACAGACTGGGACAATG-3'	
CYP2B6	forward	5'-AAAGCGGAGTGTGGAGGA-3'	FAM-5'- AGGAGGAG-3'- BHQ1
	reverse	5'-AAGGTGGGGTCCATGAGG-3'	
CYP2C9	forward	5'-GTGCACGAGGTCCAGAGATAC-3'	FAM-5'- CTTCTCCC-3'- BHQ1
	reverse	5'-CAGGGAAATTAATATGGTTGTGC-3'	
CYP2C19	forward	5'- TGAAGGTGGAAATTTTAAGAAAAGTAA- 3'	FAM-5'- CAGCAGGA-3'- BHQ1
	reverse	5'-CCCTCTCCCACACAAATCC-3'	
CYP2D6	forward	5'-TTCCTCAGGCTGCTGGAC-3'	FAM-5'- AGGAGGAG-3'- BHQ1
	reverse	5'-CGCTGGGATATGCAGGAG-3'	
CYP3A4	forward	5'-CATGGACTTTTTAAGAAGCTTGG-3'	FAM-5'- CTCTGCCT-3'- BHQ1
	reverse	5'-TTCCATGTCAAACATACAAAAGC-3'	
GAPDH	forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	FAM-5'- TGGGGAAG- 3'BHQ1
	reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	

4.9.2. SNP (Single Nucleotide Polimorphism) és egy bázis deléció kimutatása hidrolízis SNP analízissel

A *CYP* gének SNP analízise során egy pontmutáció (báziscsere vagy bázis deléció) kimutatása a cél. A PCR reakcióhoz két próbát alkalmaztunk, amelyeket a mutációs pont köré terveztünk. A próbák szekvenciája teljesen megegyezik, egyedül a mutációs ponton mutat eltérést. A reakcióelegyben levő próbák versengenek a genomiális DNS-sel való hibridizáció során. Ha az adott ponton nincs mutáció a genomiális DNS-ben, akkor a vad típusú próba szorosabban kötődik és leszorítja a kisebb affinitással kötődő mutáns típusú próbát. Ez fordítva is igaz, mutáció esetén a mutáns próba kötődik erősebben. A vad, illetve mutáns próbákat két eltérő fluoreszcens festékkel jelöltük, amelyek gerjesztéskor különböző hullámhosszúságú látható fényt emittálnak. Homozigóta vad genotípus esetén optimális reakció körülmények között csak a vad típusú próba ad fluoreszcens jelet, heterozigóta genotípusnál a vad és a mutáns próba fluoreszcens jele együttesen jelenik meg, míg homozigóta mutáns egyén esetén csak a mutáns próba fluoreszcens jele detektálható.

A gyógyszer-metabolizmusban résztvevő *CYP* enzimeknél a fehér populációban leggyakrabban előforduló mutációkat határoztuk meg, hat báziscsere (*CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2, *CYP2C19**3, *CYP2D6**4 és *CYP3A5**3) és két bázis deléció (*CYP2D6**3 és *CYP2D6**6) kimutatását végeztük el. A kimutatáshoz használt primerek és próbák szekvenciáit a 14. táblázat tartalmazza. A reakciók során felhasznált primereket és próbákat a Biosearch Technologies szintetizálta. A reakciók során használt enzimkeverékek a következők: iQ SUPERMIX (BioRad Laboratories) és LightCycler® 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics). A PCR reakciók körülményei a 15. táblázatban találhatóak.

14. táblázat: Az SNP kimutatásokhoz használt primer és próba szekvenciák

CYP allél		Primer szekvenciák		Jelölt próba szekvenciák*
CYP2C9*2	forward	AGCAATGGAAAGAAATGGAAG	vad	FAM-CTCTTGAACACGGTCCTC-BHQ1
	reverse	TAAGGTCAGTGATATGGAGTAGG	mutáns	CalRed610-CTCTTGAACACAGTCCTC-BHQ2
CYP2C9*3	forward	GCAAGACAGGAGCCACATG	vad	FAM-CGAGGTCCAGAGATACATTGAC-BHQ1
	reverse	AGGAGAAACAAACTTACCTTGG	mutáns	CalRed610-CGAGGTCCAGAGATACCTTGAC-BHQ2
CYP2C19*2	forward	CTTAGATATGCAATAATTTCCCAC	vad	FAM-TGATTATTTCCCGGAACCCATAAC-BHQ1
	reverse	GAAGCAATCAATAAAGTCCCGA	mutáns	CalRed610-TGATTATTTCCCAGGAACCCATAAC-BHQ2
CYP2C19*3	forward	AGATCAGCAATTTCTTAACTTGATG	vad	FAM-ACCCCCTGGATCCAGG-BHQ1
	reverse	TGTACTTCAGGGCTTGGTC	mutáns	CalRed610-ACCCCCTGAATCCAGG-BHQ2
CYP2D6*3	forward	TGGCAAGGTCCTACGC	vad	FAM-CACAGGATGACCTGGGACC-BHQ1
	reverse	TCCATCTCTGCCAGGAAG	mutáns	CalRed610-CACGGATGACCTGGGACC-BHQ2
CYP2D6*4	forward	CTTCGCCAACCCTCC	vad	CalRed610-CCCCAGGACGCCC-BHQ2
	reverse	GATCACGTTGCTCAG	mutáns	FAM-CCCCAAGACGCCC-BHQ1
CYP2D6*6	forward	TCTCCGTGTCCACCTTG	vad	FAM-GCTGGAGCAGTGGGTGAC-BHQ1
	reverse	GCGAAGGCGGCACA	mutáns	CalRed610-GCTGGAGCAGGGGTGAC-BHQ2
CYP3A5*3	forward	GAGAGTGGCATAGGAGATACC	vad	FAM-TTTGTCTTTCAATATCTCTTCCCTGT-BHQ1
	reverse	TGTACGACACACAGCAACC	mutáns	CalRed610-TTTGTCTTTCA G TATCTCTTCCCTGT-BHQ2

*A próba szekvenciákban a mutációs pontot vastag betűvel jeleztem.

15. táblázat: A CYP génhibák kimutatásánál alkalmazott PCR mérések körülményei

Paraméter	CYP2C9*2	CYP2C9*3	CYP2C19*2	CYP2C19*3	CYP2D6*3	CYP2D6*4	CYP2D6*6	CYP3A5*3
Primer koncentráció	200 nM	200 nM	200nM	200 nM	250 nM	500 nM	500 nM	200 nM
Próba koncentráció (vad)	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	100 nM	50 nM	50 nM
Próba koncentráció (mutáns)	100 nM	100 nM	50 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	50 nM
Reagens	IQ Supermix	Light Cycler 480 Probes master	IQ Supermix	IQ Supermix	Light Cycler 480 Probes master	Light Cycler 480 Probes master	Light Cycler 480 Probes master	IQ Supermix
Primer kapcsolás	57°C	63°C	60°C	58°C	60°C	55°C	59°C	60°C
Enzimaktiválás 95°C-on (perc)	3	10	3	3	10	10	10	3
Ciklus: 45-50 ciklus	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec	95°C, 10 sec
	57°C, 30 sec	63°C, 30 sec	60°C, 30 sec	58°C, 30 sec	60°C, 30 sec	55°C, 30 sec	59°C, 30 sec	60°C, 30 sec

4.10. CYP-genotipizálás HRM (High Resolution Melting Curve) analízissel

A HRM analízis szintén alkalmas mutációk kimutatására, azonban hidrolízis próbák helyett interkaláló (kettős DNS szálhoz kötődő) fluoreszcens festéket használunk. Az interkaláló festék önmagában nem ad jelet, azonban a kettős-szálú DNS-hez kötődve zöld fluoreszcens jelet generál. A PCR reakcióelegy tartalmazza a primer párt, a Taq DNS polimeráz enzimet, az interkaláló festéket, a dNTP-eket és MgCl₂-ot. Vizsgálataink során EvaGreen interkaláló festéket használtunk (SsoFast EvaGreen Supermix, BioRad Laboratories). Az eljárás lényege, hogy a PCR reakció során megjelenő kettős szálú PCR termékhez kötődik az interkaláló festék és fluoreszcens jelet ad. Az amplifikációs ciklusok végeztével olvadáspont analízist végzünk, minek során lassan 65⁰C-ről 95⁰C-ra emeljük a hőmérsékletet (0,02⁰C/sec). Ahogy a hőmérséklet emelkedik, a kettős szálú DNS szétnyílik és a fluoreszcens jel egyre csökken. A PCR termék olvadás pontja ott van, ahol a kettős szálú PCR termék fele egy szálúvá alakul. Az olvadáspont különbségekből már egy bázis eltérés is kimutatható.

A génhibák HRM módszerrel történő kimutatásához a primereket úgy terveztük a mutációs hely köré, hogy az amplicon hossza ne legyen nagyobb, mint 100 bázispár. Ezért a hidrolízis SNP vizsgálatoknál alkalmazott primereket – amelyek 164 bázispárnyi amplicont határolnak – módosítanunk kellett. A CYP2C19*2 genotípus HRM analízissel való meghatározásához felhasznált primerek szekvenciái (5'-3' irányban): forward CTTAGATATGCAATAATTTTCCCAC, reverse: CTTTCCATAAAAGCAAGGTT (Biosearch Technologies). Így az amplicon hossza 88 bázispár. A PCR reakcióelegy 500-500 nM primert, 0,5 ng/μl genomiális DNS-t és EvaGreen-t (SsoFast EvaGreen Supermix, BioRad Laboratories) tartalmazott. A PCR hőmérséklet protokollja: enzimaktiválás 98⁰C-on 3 percig, 50 ciklus (denaturálás 98⁰C-on 2 sec, lánchosszabbítás 62⁰C-on 3 sec). Olvadáspont analízis során a hőmérsékletet 65⁰C-ről 95⁰C-ra emeltük 0,02⁰C/sec-onként. A detektálás az olvadáspont analízisnél minden 0,1⁰C-os hőmérséklet emelkedés után történt. Az olvadáspont görbék kiértékelését a Precision Melt Analysis software-el (BioRad Laboratories) végeztük.

4.11. A PCR termékek ellenőrzése

A CYP fenotípus és genotípus meghatározások során termelődött ampliconokat elektroforézis vizsgálatokkal és szekvencia meghatározással ellenőriztük. Az egyes PCR reakciókat megismételtük próbák nélkül és előállítottuk a megfelelő hosszúságú ampliconokat. A PCR reakció után agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük, hogy megfelelő

hosszúságú amplikonok keletkeztek-e. Többféle elektroforézis rendszert használtuk: i) Experion DNA 1K Analysis Kit (BioRad Laboratories), ii) FlashGel System (Lonza, Basel, Switzerland) 1,2 % agaróz gélt tartalmazó DNS kazettákkal (50 bázispár- 4000 bázispár hosszú DNS fragmensek szétválasztására). Miután gélelektroforézissel igazoltuk a megfelelő hosszúságú amplikonok termelődését, az amplikonok szekvenciája is meghatározásra került (Macrogen Europe, Amsterdam, Hollandia és Biomi Kft., Gödöllő).

4.12. Statisztikai értékelés

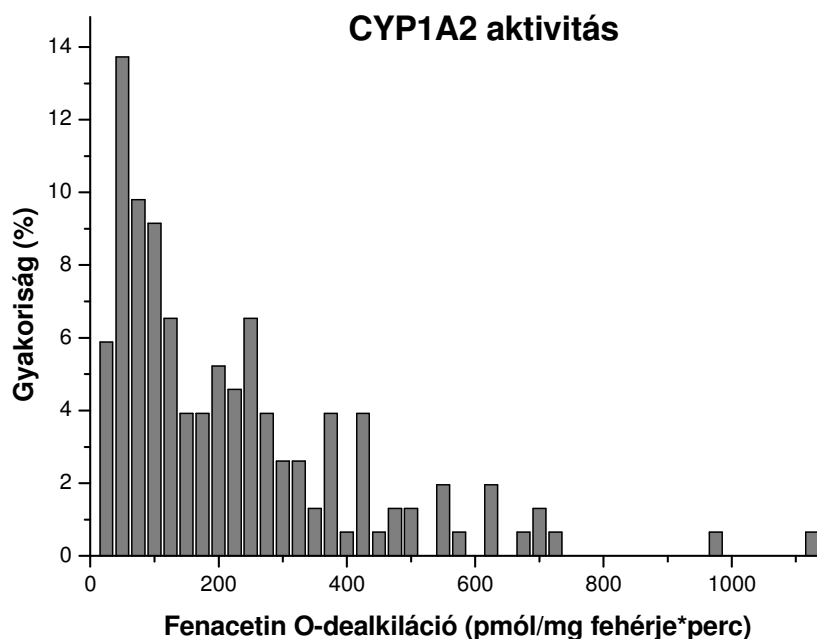
164 donornál meghatároztuk a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimaktivitásokat és megvizsgáltuk, hogy az aktivitások milyen gyakorisági eloszlást mutatnak. Az aktivitás értékek eloszlása nem bizonyult szimmetrikusnak, ezért az átlag értékek helyett a medián értékeket, standard deviáció (SD) helyett a kvartilis deviációt (QD) kalkuláltuk. Három fenotípus csoportba soroltuk a donorokat (gyenge, átlagos és extenzív metabolizálók), a csoportok elkülönítésére pedig két határértéket (cut-off érték) állapítottunk meg minden CYP enzimaktivitásnál. Az asszimmetrikus eloszlás miatt kvartilis értékek határozták meg a csoportok közti határértékeket. Az első és harmadik kvartilist jelöltük ki a gyenge-átlagos, valamint az átlagos-extenzív metabolizáló csoport elkülönítésére.

A CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 gének expressziójának mértékét is meghatároztuk mind a májban, mind a fehérvérsejtekben. Megvizsgáltuk, hogy a CYP mRNS mennyiségek a májban, illetve a fehérvérsejtben korrelálnak-e a CYP enzimaktivitás értékekkel. A korrelációs vizsgálatokból kizártuk a homozigóta mutáns, illetve a heterozigóta egyéneket, kivéve a CYP3A esetében. A CYP3A analízisből a CYP3A5 homozigóta vad, illetve heterozigóta genotípusú egyéneket zártuk ki. Megbecsültük a CYP aktivitások és a CYP mRNS szintek közti korrelációt, kalkuláltuk a 95%-os konfidencia intervallumot, valamint a Spearman-féle korrelációs koefficiens (r_s) (GraphPad InStat version 3.05, San Diego, CA). A CYP génexpresszió és a máj CYP aktivitása közötti összefüggést szorosnak tekintettük, ha a valószínűségi változó értéke (P) kisebb volt, mint 0,0001.

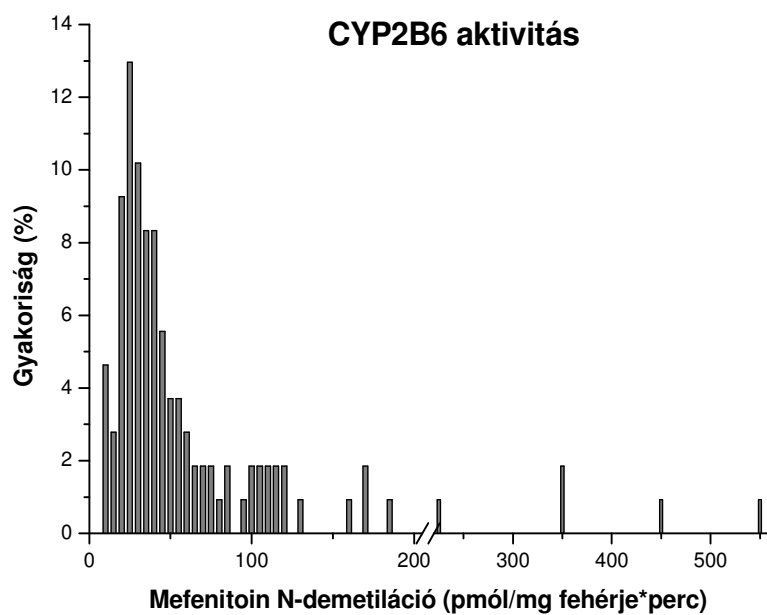
5. Eredmények

5.1. CYP enzimaktivitásokban mutatkozó különbségek

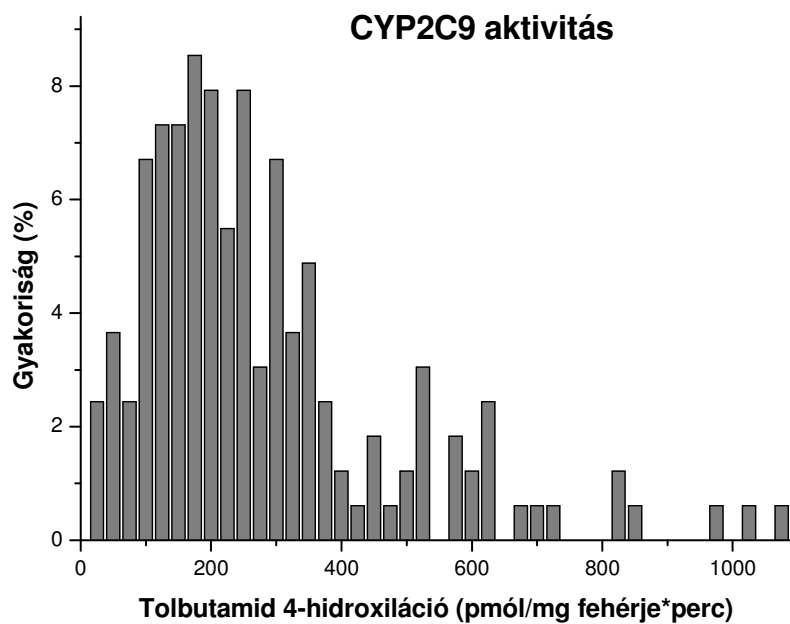
A máj gyógyszer-lebontó kapacitását jelentős mértékben meghatározzák a testidegen anyagok metabolizmusában fontos szerepet játszó CYP enzimek. Ezért meghatároztuk a gyógyszer-metabolizmus szempontjából jelentősebb CYP enzimek specifikus aktivitás értékeit máj mikroszóma frakcióban 164 magyarországi kadaver donornál. CYP-szelektív szubsztrátokat alkalmazva mértük az inkubálás során keletkezett metabolitok mennyiségét HPLC-UV-vel, illetve HPLC-MS-el. A 9. a-h ábrák a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A enzimek aktivitási gyakoriságait mutatják. A CYP specifikus enzim aktivitások mértékében 80-750-szeres különbségek is előfordultak, szélső esetekben teljes aktivitás hiányt is megfigyeltünk, és voltak kiugróan magas értékek is (16. táblázat). A donorok CYP enzimaktivitásai nem Gauss, hanem aszimmetrikus eloszlást mutattak, az alacsonyabb aktivitás tartományokba több donor tartozott, mint a magasabb aktivitás tartományokba. Ezért a median \pm QD értékeket határoztuk meg. Az első és harmadik kvartilis jelöli a gyenge és átlagos, illetve az átlagos és extenzív metabolizálók közti határértékeket (16. táblázat).



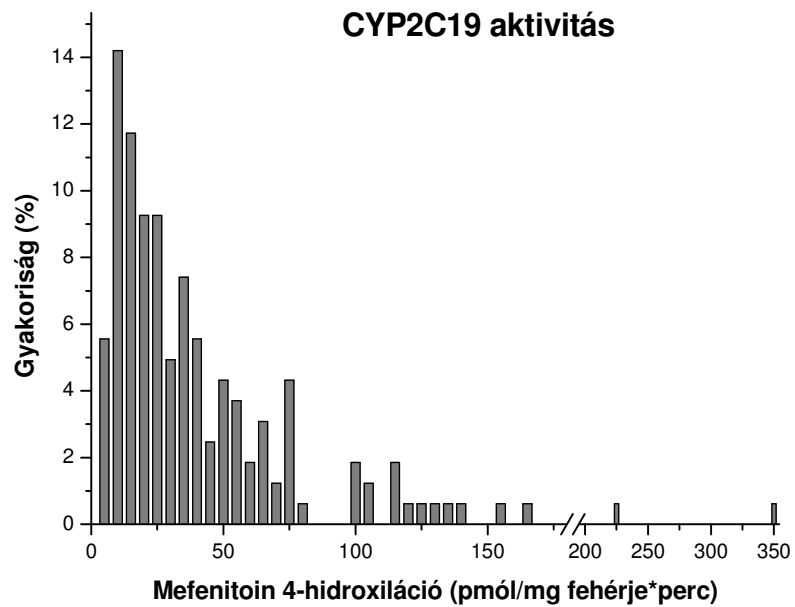
9/a ábra: A CYP1A2 specifikus fenacetin O-dealkiláz aktivitás eloszlása



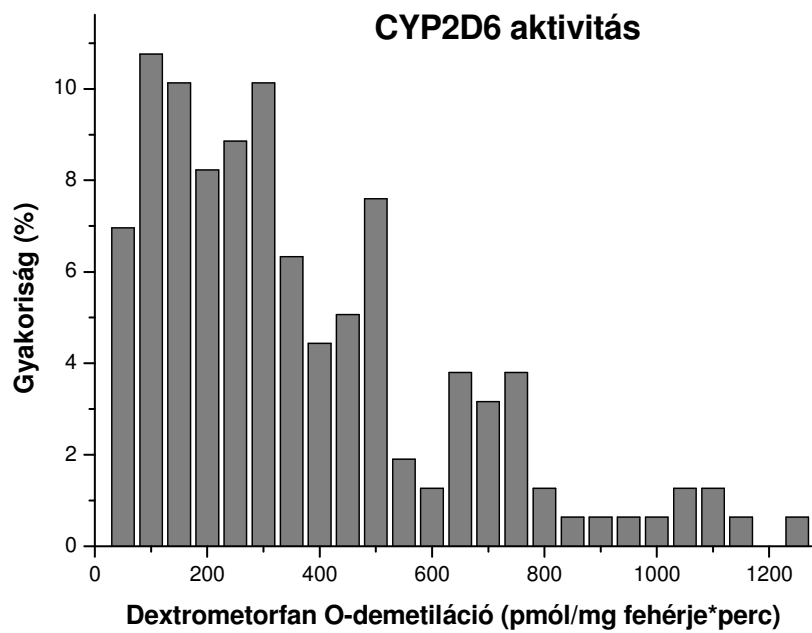
9/b ábra: A CYP2B6 specifikus mefenitoin N-demetiláz aktivitás eloszlása



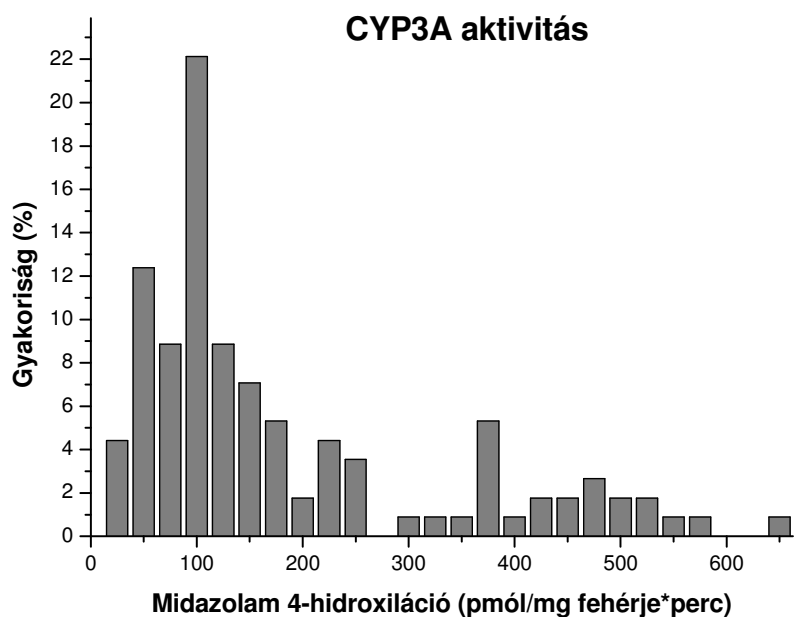
9/c ábra: A CYP2C9 specifikus tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitás eloszlása



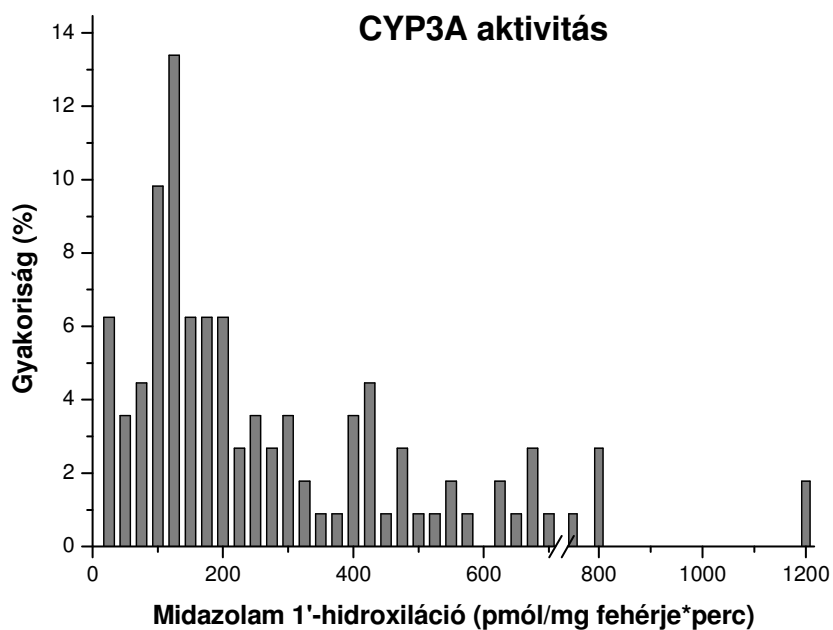
9/d ábra: A CYP2C19 specifikus mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitás eloszlása



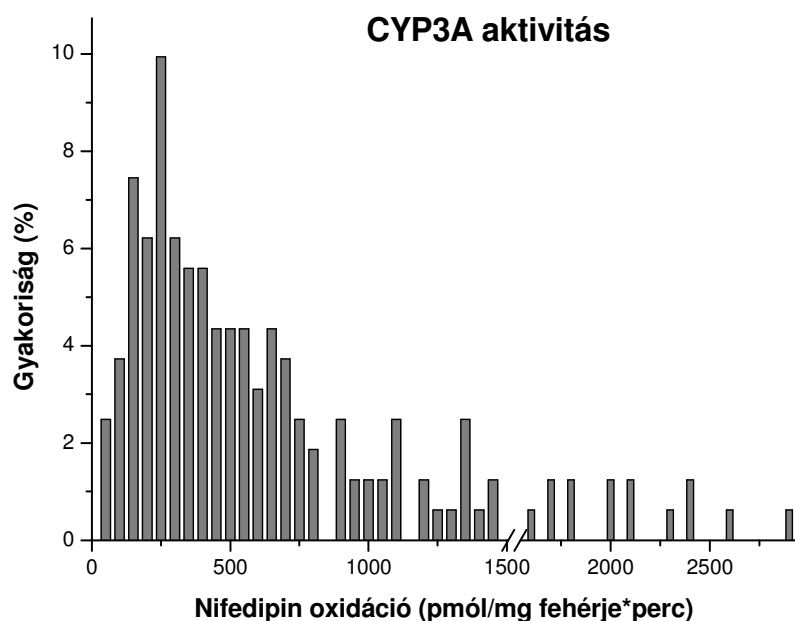
9/e ábra: A CYP2D6 specifikus dextrometorfan O-demetiláz aktivitás eloszlása



9/f ábra: A CYP3A specifikus midazolam 4-hidroxiláz aktivitás eloszlása



9/g ábra: A CYP3A specifikus midazolam 1'-hidroxiláz aktivitás eloszlása



9/h ábra: A CYP3A specifikus nifedipin oxidáz aktivitás eloszlása

16. táblázat: A specifikus CYP enzim aktivitásokban jelentkező különbségek (n=164). Az értékek pmól termék/[mg mikroszóma fehérje*perc]-ben értendők.

CYP	Enzim aktivitás	Min.	Max.	Cut-off értékek	
				PM-IM* 1. kvartilis	IM-EM* 3. kvartilis
	medián±QD				
CYP1A2 fenacetin O-dealkiláz	155,9±110,75	0	1107,1	60,2	281,7
CYP2B6 MefenitoinN-demetiláz	35,7±22,20	6,47	538,3	22,3	66,7
CYP2C9 tolbutamid 4-hidroxiláz	218,2±100,55	0	1056,0	104,4	305,6
CYP2C19 mefenitoin 4'-hidroxiláz	25,2±19,15	0	342,9	11,9	50,2
CYP2D6 Dextrometorfan O-demetiláz	261,0±162,0	0	1461,0	140,6	464,6

CYP3A4/5					
nifedipin oxidáz	414,2±272,25	3,79	2861,5	231,8	776,3
midazolam 4-hidroxiáz	175,2±141,25	11,9	1180,0	101,1	383,6
midazolam 1'-hidroxiáz	107,7±77,4	3,42	630,7	72,8	227,6

*PM: gyenge metabolizáló; IM: átlagos metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló

5.2. CYP enzimek expressziója a májban

A CYP specifikus enzim aktivitás vizsgálatok nagy mennyiségű májszövetet igényelnek, ami jelentős hátrányt jelent a klinikai gyakorlatban. A tübiopsziával nyerhető májszövet mennyisége azonban nem elegendő az enzim aktivitás meghatározásokhoz. Kvantitatív real-time PCR-el azonban már kis mennyiségű máj mintából is meghatározhatók az egyes CYP mRNS mennyiségek. Amennyiben a májban levő CYP mRNS szintek szoros korrelációt mutatnak a specifikus enzim aktivitásokkal, a kvantitatív real-time PCR technika használható módszert jelent a máj gyógyszer-lebontó képességének meghatározására.

Meghatároztuk az egyes CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) mRNS szinteket ugyanazon donorok májszövetében, akiknél CYP enzimaktivitás méréseket is elvégeztük. A primereket a PCR reakciókhoz két egymást követő exonra terveztük, hogy az esetleges genomiális DNS szennyezésből adódó hibákat kiküszöböljük. Minden egyes CYP mRNS detektálható mennyiségben volt jelen a májszövetben. A CYP enzimaktivitásokhoz hasonlóan a GAPDH-hoz viszonyított CYP mRNS mennyiség értékek is nagy egyedi eltéréseket mutattak (17. táblázat). A CYP3A4 mRNS szintek között voltak a legnagyobb egyedi eltérések, a legalacsonyabb és legmagasabb CYP3A4 expressziós érték között három nagyságrend különbség volt. A CYP2D6-nál jóval kisebb a variabilitás, a mRNS értékekben mindössze 20-szoros különbség látható.

17. táblázat: Humán donorok relatív CYP mRNS mennyiségei májszövetben és leukocitákban. Az értékek a relatív CYP mRNS $\cdot 10^{-3}$ -t mutatják.

CYP	CYP mRNS szintek medián \pm QD	Min.	Max.
CYP1A2 - máj leukociták	89,2 \pm 55,15 0,419 \pm 0,5026	3,92 0,0168	678,3 4,78
CYP2B6 - máj leukociták	57,91 \pm 42,80 3,26 \pm 4,643	10,9 0,00454	607,1 166,1
CYP2C9 - máj leukociták	453,8 \pm 237,32 0,0178 \pm 0,01031	30,4 0,00022	1853,2 0,0982
CYP2C19 - máj leukociták	179,9 \pm 130,14 0,0057 \pm 0,0056	10,17 0,000048	1635,8 0,0761
CYP2D6 - máj leukociták	219,7 \pm 132,86 5,68 \pm 40,63	67,92 0,148	1274,6 16,056
CYP3A4 - máj leukociták	484,7 \pm 406,8 0,0362 \pm 0,0184	2,31 0,000009	4316,9 0,218

5.3. A máj CYP enzim aktivitásai és CYP expressziója közti korreláció

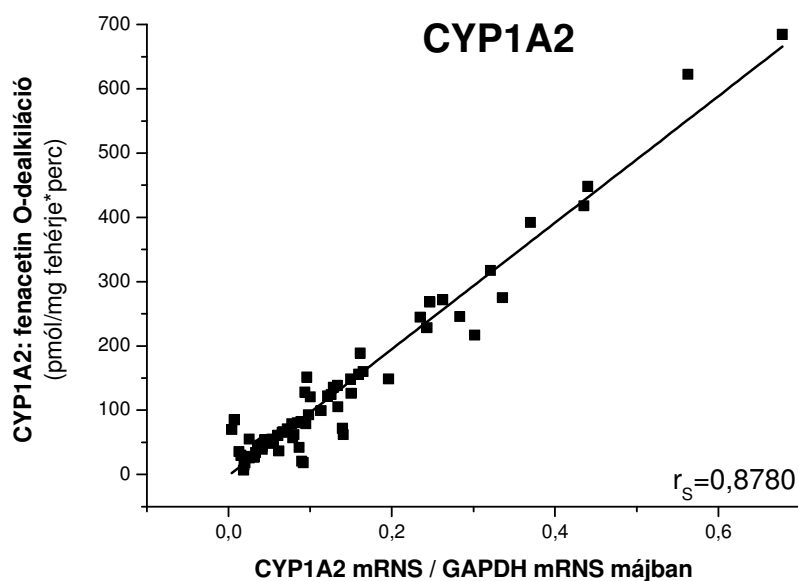
A CYP enzimaktivitás és CYP mRNS mennyiség kapcsolatát a májban már többen vizsgálták (Sumida et al., 1999; Rodriguez-Antona et al., 2001). Vizsgálatainkban meghatároztuk humán donorok májszövetében a CYP enzim aktivitások és a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 mRNS szintek közti összefüggéseket (n=117-164). Feltételezhető, hogy a májban mérhető CYP mRNS mennyiségek tükrözik a máj CYP enzimaktivitásait, azonban a csökkent CYP enzimfunkciót eredményező genetikai polimorfizmusok torzíthatják az eredményeket. Ugyanis a csökkent működőképességű vagy működésképtelen enzimet eredményező mutációval rendelkező egyének (heterozigóta vagy homozigóta mutáns) CYP mRNS szintjeiből jelentősen magasabb enzim aktivitásokra következtethetnénk. Ezért a CYP enzimaktivitások és mRNS szintek mellett meghatároztuk a kaukázusi vagy fehér populációban gyakran előforduló CYP génhibákat is.

A máj CYP1A2 és CYP2B6 mRNS szintek, illetve a fenacetin O-dealkiláz és mefenitoin N-demetiláz aktivitások közti összefüggések szignifikánsnak bizonyultak (10/a, 10/b ábrák). Gyengébb korrelációt kaptunk az enzimaktivitások és a mRNS expresszió között

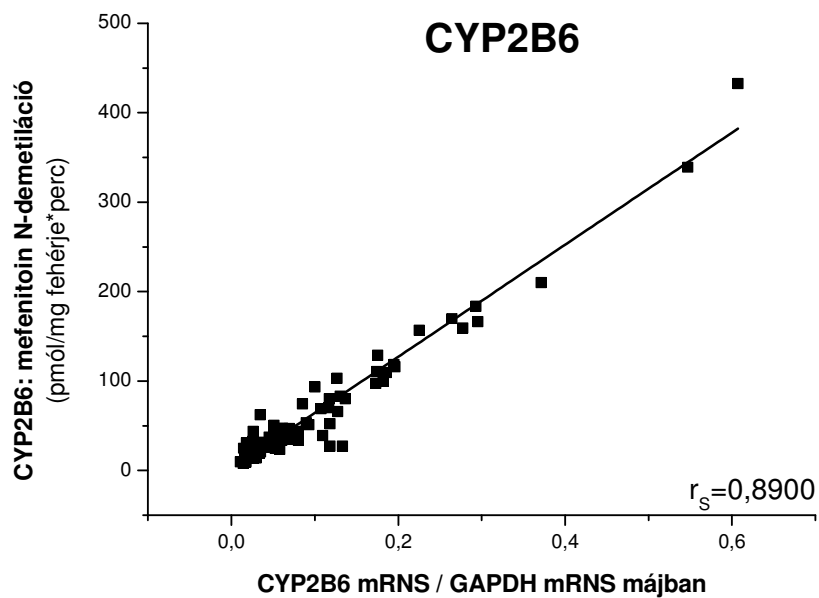
a CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimeknél, ha az összes donor eredményét bevontuk az analízisbe függetlenül a genotípustól. A kaukázusi populációban viszonylag gyakran fordul elő a CYP2C9*2 (430 C>T) és a CYP2C9*3 (1075 A>C) mutáció, ami csökkent működőképességű CYP2C9 enzimet eredményez. A donorok között a CYP2C9*2, illetve CYP2C9*3 allél gyakorisága 7,9 % és 7 % volt. A mutáns CYP2C9 allélt hordozó (homozigóta mutáns, vagy heterozigóta) donorokat kizártuk a korrelációs analízisből (10/c ábrán a piros színű pontok), és így a homozigóta vad (CYP2C9*1/*1) genotípusú donoroknál szoros korrelációt tapasztaltunk a májban mérhető tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitás és a CYP2C9 mRNS mennyiségek között ($r_s=0,9255$) (10/c ábra és 18. táblázat). A CYP2C19 génben található mutációk (CYP2C19*2 és CYP2C19*3) következtében működésképtelen enzim expresszálódik. Munkánk során meghatároztuk a donorok CYP2C19*2 (681 G>A) és CYP2C19*3 (636 G>A) mutációit is. A CYP2C19*2 mutáns allél gyakoriság 18,3 %-nak bizonyult, míg egyáltalán nem találtunk CYP2C19*3 génhibát hordozó allélt. Miután kizártuk a korrelációs analízisből a CYP2C19*2 allélt hordozó donorokat (10/d ábrán a piros színű pontok), a homozigóta vad genotípusú donoroknál (CYP2C19*1/*1) a májban mérhető mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitások szignifikáns korrelációt mutattak a máj CYP2C19 mRNS szintekkel ($r_s=0,8808$) (10/d ábra és 18. táblázat). A CYP2D6 génen található mutációk közül három lényeges génhiba, a CYP2D6*3 (2549delA), a CYP2D6*4 (1846G>A) és a CYP2D6*6 (1795delT) mutációk meghatározását végeztük el a donoroknál. A CYP2D6*3 és a CYP2D6*4 génhibák inaktív enzimet, míg a CYP2D6*6 mutáció a működőképes enzim teljes hiányát okozza. A CYP2D6*4 allél gyakoriság viszonylag magasnak (17,4 %) bizonyult, míg a CYP2D6*3 és CYP2D6*6 mutáns allél gyakoriságok alacsonyak (0,89 % mindkét esetben) voltak. A korrelációs analízist a CYP2D6 homozigóta vad (CYP2D6*1/*1) genotípusú donoroknál végeztük el és szoros korrelációt találtunk a máj CYP2D6 mRNS mennyiségei és a dextrometorfan O-demetiláz aktivitásai között ($r_s=0,8808$) (10/e ábra és 18. táblázat). Az analízisből kizártuk a CYP2D6*3, CYP2D6*4, vagy CYP2D6*6 mutáns allélt hordozó donorokat (10/e ábrán a piros színű pontok).

A máj teljes CYP3A enzim készletének zömét (90 %) a CYP3A4, míg mindössze 7-8 %-át a CYP3A5 teszi ki, de a CYP3A szubsztrátok metabolizmusában a CYP3A4 mellett a CYP3A5 is részt vehet. A CYP3A5*3 mutáció (6986 A>G, 3.intronon) egy splicing rendellenességet okoz, ami a CYP3A5 enzim teljes hiányát eredményezi. A CYP3A5*3 mutáns allél gyakoriság a kaukázusi populációban magasabb, mint 90 %. A donorok esetében hasonló eredményt kaptunk, a homozigóta mutáns (CYP3A5*3/*3) genotípus gyakoriság 89,5 % volt, ami azt jelenti, hogy a magyarországi donorok legnagyobb részénél egyáltalán

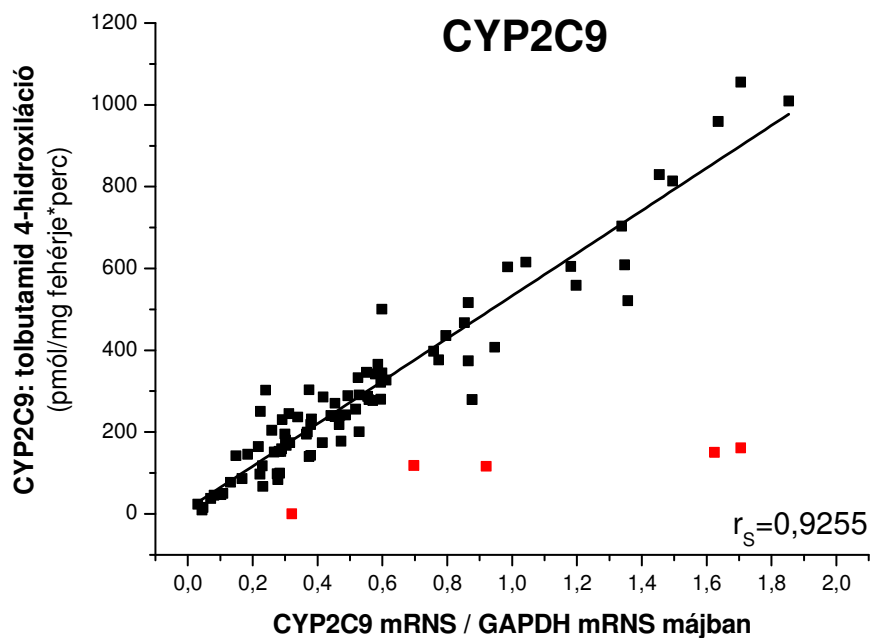
nem fejeződik ki CYP3A5 enzim. Azok a donorok, akiknél mégis jelen van a CYP3A5 enzim (CYP3A5*1/*3, illetve CYP3A5*1/*1 genotípusúak) gyorsabban metabolizálják a CYP3A szubsztrátokat (pl.: takrolimusz, ciklosporin A, nifedipin, midazolam), mint azok, akiknél nem fejeződik ki a CYP3A5 enzim. A donorok között nem találtunk CYP3A5*1/*1 genotípusú egyént, csak heterozigótákat (CYP3A5*1/*3 genotípusú). A vad típusú allél gyakoriság (CYP3A5*1) a donorok között 5,5 %-nak bizonyult. Miután kizártuk az analízisből a CYP3A5*1/*3 genotípusú donorokat (10. f-h ábrákon a piros színű pontok), szoros összefüggést találtunk a CYP3A4 expresszió és a CYP3A specifikus enzimaktivitások (nifedipin oxidáció: $r_s=0,8984$; midazolam 1'-és 4 hidroxiláció: $r_s=0,8112$ és $r_s=0,8001$) között a májban (10/h-f ábrák és 18. táblázat). Amellett, hogy az r_s számértékek 1-hez közel estek, a valószínűségi értékek is 0,0001 alatt voltak minden esetben, ami szoros korrelációra utal (18. táblázat).



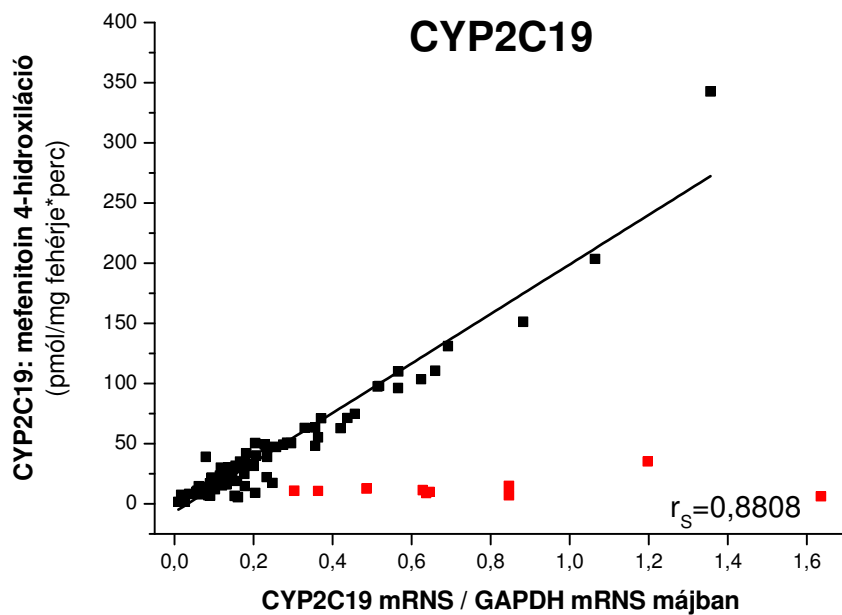
10/a ábra: A máj relatív CYP1A2 mRNS szintje és a CYP1A2 enzimaktivitása közti korreláció.



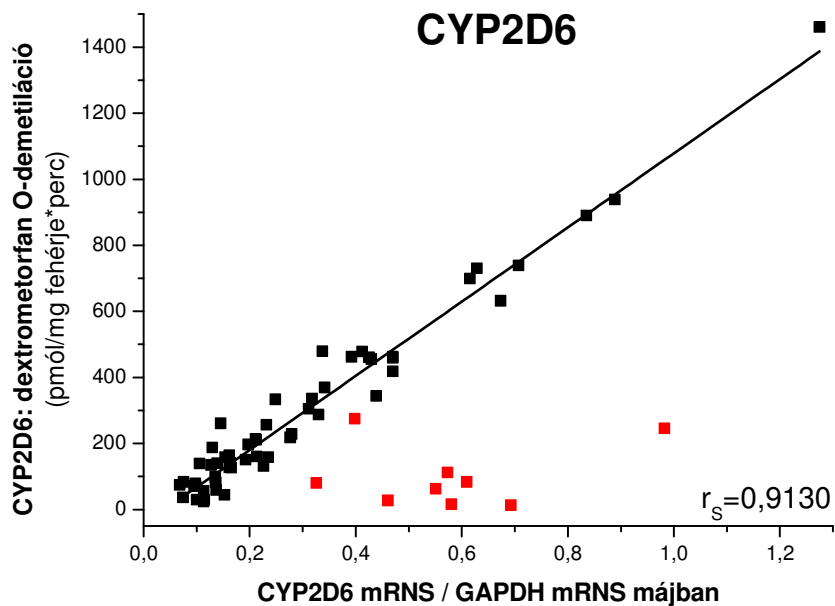
10/b ábra: A máj relatív CYP2B6 mRNS szintje és a CYP2B6 enzimaktivitása közötti korreláció.



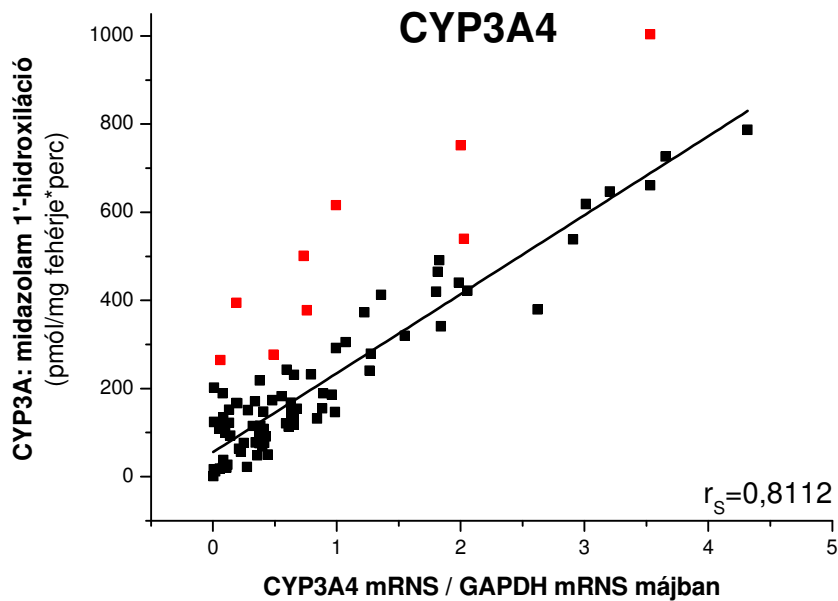
10/c ábra: A máj relatív CYP2C9 mRNS szintje és a CYP2C9 enzimaktivitása közötti korreláció.



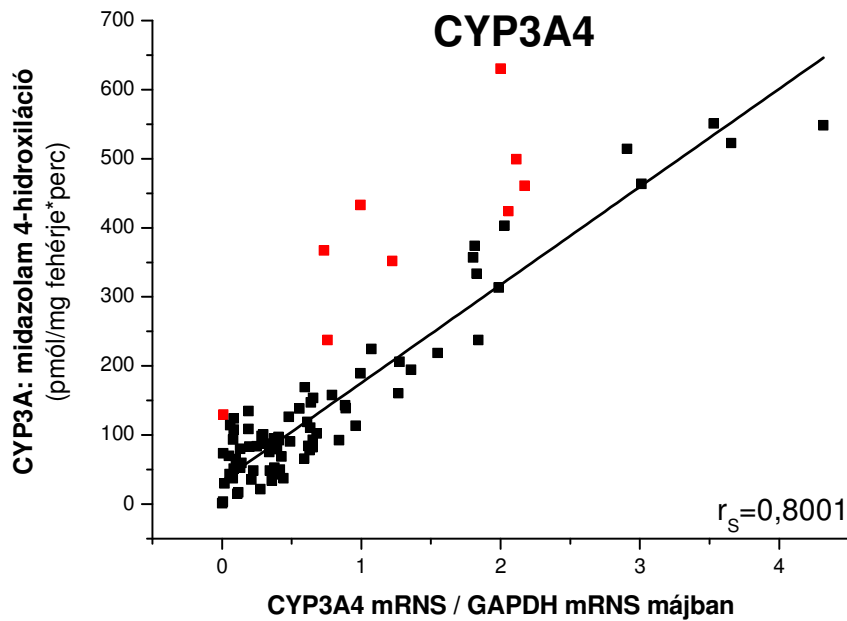
10/d ábra: A máj relatív CYP2C19 mRNS szintje és a CYP2C19 enzimaktivitása közti korreláció.



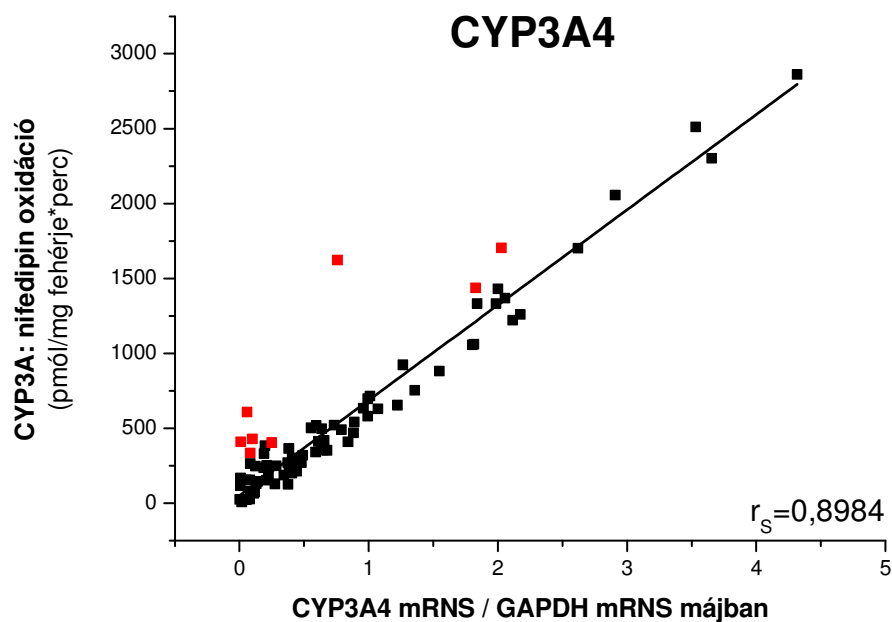
10/e ábra: A máj relatív CYP2D6 mRNS szintje és a CYP2D6 enzimaktivitása közti korreláció.



10/f ábra: A máj relatív CYP3A4 mRNS szintje és a CYP3A enzimaktivitása (midazolam 1' hidroxiláció) közti korreláció.



10/g ábra: A máj relatív CYP3A4 mRNS szintje és a CYP3A enzimaktivitása (midazolam 4 hidroxiláció) közti korreláció.



10/h ábra: A máj relatív CYP3A4 mRNS szintje és a CYP3A enzimaktivitása (nifedipin oxidáció) közti korreláció.

5.4. CYP enzimek expressziója leukocitákban

A májból történő tübiopszia vétel kockázatos, és bonyolult, ezért a máj gyógyszerlebontó kapacitásának meghatározása vérből egy technikailag jóval kedvezőbb megoldást jelentene a klinikai gyakorlatban. A CYP expresszió meghatározásához a perifériás vérből izolálható leukociták alkalmasabbnak tekinthetők, mint a teljes vér vagy a vörösvértestek. Ugyanis az érett vörösvértestekben már nincs jelen a sejtmag, aktív mRNS szintézis már nem zajlik, vagyis a különböző gének mRNS szintje legjobb esetben is csak a sejtmag kilökődése előtti állapotot mutathatja, külső hatásokra bekövetkező transzkripciós változások már nem történnek.

Perifériás vérből fehérvérsejteket izoláltunk és meghatároztuk a CYP expressziót (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 mRNS) ugyanazon donoroknál, akiknél CYP enzimaktivitás méréseket végeztünk májszövetből. Minden egyes CYP mRNS detektálható mennyiségben volt jelen a donorok leukocitáiban. A leukocitákban és a májban lévő CYP expressziós profil bizonyos hasonlóságot mutatott, azonban a mRNS szintek jelentősen alacsonyabbak voltak a fehérvérsejtekben, általában 10^2 - 10^4 -szeres különbségek mutatkoztak a CYP2B6 és CYP2D6 enzimeket kivéve (17. táblázat). A CYP2B6

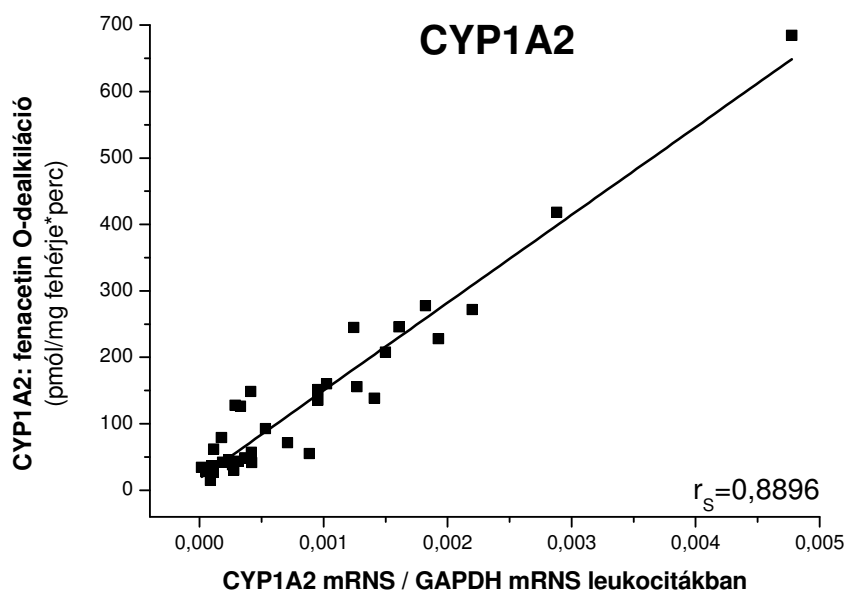
és CYP2D6 gének expressziója 20- és 40-szer magasabb volt a májban, mint a leukocitákban. Jelentős egyéni eltérések is mutatkoztak a donorok leukocitákban történő CYP expressziójában. A legnagyobb egyedi különbségeket (10^4 - 10^5 -szörös) a CYP2B6, CYP2D6 és CYP3A4-nél találtuk. A CYP1A2 és CYP2C9 mRNS szintek között mindössze 285, illetve 445-szörös eltérések mutatkoztak.

5.5. Korreláció a CYP enzim aktivitások és a leukocitákban történő CYP expresszió között

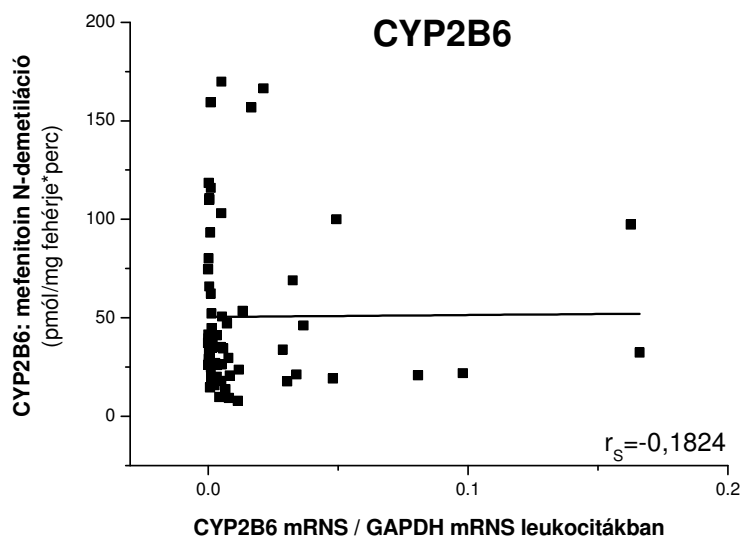
A klinikai alkalmazás szempontjából az egyik legegyszerűbb mintavételi lehetőség a vérvétel, illetve a vérből történő leukocita izolálás, amennyiben a leukociták tájékoztatást nyújtanak a máj gyógyszer-metabolizáló képességről. Célunk az volt, hogy összefüggést mutassunk ki a máj specifikus CYP enzim aktivitásai és a leukocitákban történő CYP expresszió között. Real-time PCR reakcióval meghatároztuk a donorok fehérvérsejtjeiben a relatív CYP mRNS szinteket. Szorosnak tekintettük az összefüggést a májban mérhető CYP enzimek specifikus aktivitása és a leukocitákban levő CYP mRNS mennyiségek között, ha a Spearman-féle korrelációs koefficiens (r_s) magasabb volt 0,7-nél és a valószínűségi érték (P) kisebb volt 0,0001-nél.

A CYP1A2 mRNS szintek leukocitákban szignifikáns korrelációt mutattak a máj fenacetin O-dealkiláz aktivitásával ($r_s=0,8896$) (11/a ábra). A leukocitákban történő korrelációs vizsgálatok esetében is kizártuk az analízisből azokat a donorokat, akik CYP2C9 mutáns allélt (CYP2C9*2, vagy CYP2C9*3) hordoztak (11/c ábrán a piros színű pontok). Szoros korrelációt állapítottunk meg a leukocita CYP2C9 mRNS szintek és a máj tolbutamid 4-hidroxiláz aktivitása között ($r_s=0,9179$) (11/c ábra). A CYP2C19*1/*1 genotípusú donorok esetében szoros összefüggést találtunk a CYP2C19 leukocitákban történő expressziója és a májban levő mefenitoin 4-hidroxiláció között ($r_s=0,8018$) (11/d ábra). A korrelációs analízis során kihagytuk a CYP2C19*2 allélt hordozó donorokat (11/e ábrán a piros színű pontok). Ezen felül a májban levő CYP3A enzimaktivitások (nifedipin oxidáció, midazolam 1'-hidroxiláció, midazolam 4-hidroxiláció) és a leukocita CYP3A4 mRNS szintek között is erős korrelációt állapítottunk meg a CYP3A5*3/*3 genotípusú donoroknál ($r_s=0,9475$; $0,7718$; $0,8078$) (11/h-f ábrák). A vad típusú CYP3A5*1 allélt hordozó donorokat kivettük az analízisből (11 f-h ábrákon a piros színű pontok). A 18. táblázat adataiból is látható, hogy a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek esetében a leukocitákban történő CYP expresszió mértéke tükrözi a májban levő specifikus enzim aktivitásokat. A CYP2B6 és a

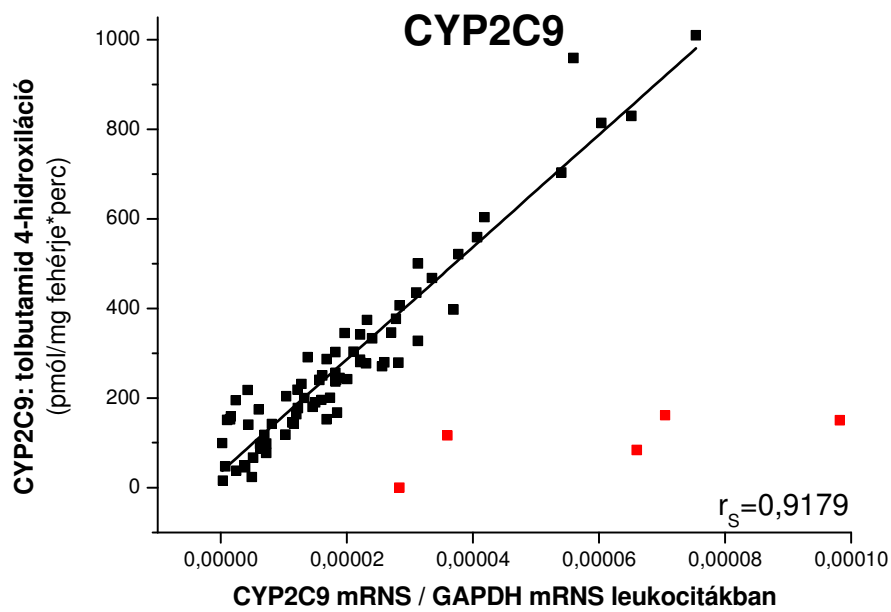
CYP2D6 gének expressziója fehérvérsejtekben nem mutatott korrelációt a májban levő mefenitoin N-demetiláz és dextrometofan O-demetiláz aktivitásokkal (*CYP2B6*-nál az $r_s=-0,1828$, a $P=0,1525$; *CYP2D6*-nál az $r_s=0,07087$, a $P=0,5905$) (11/b, 11/e ábrák és 18. táblázat).



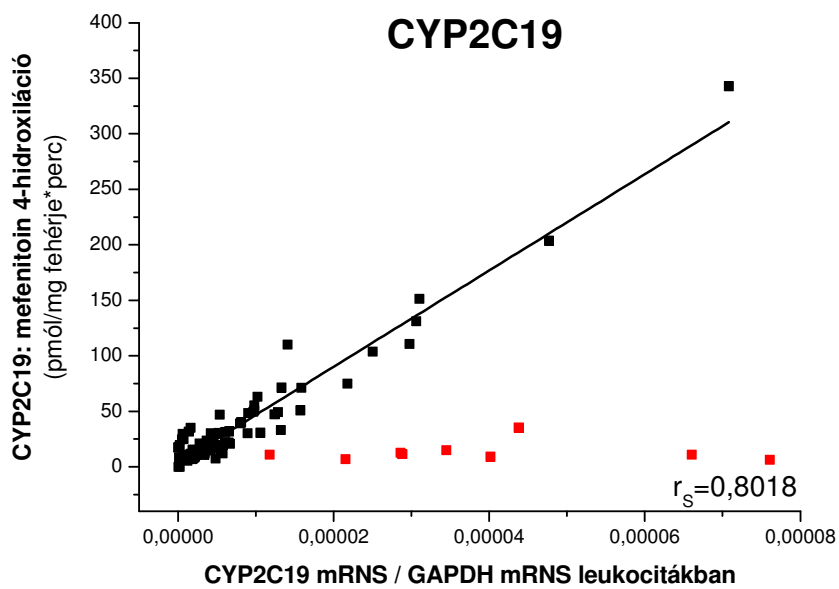
11/a ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP1A2 mRNS szintek és a máj CYP1A2 enzimaktivitása közti korreláció.



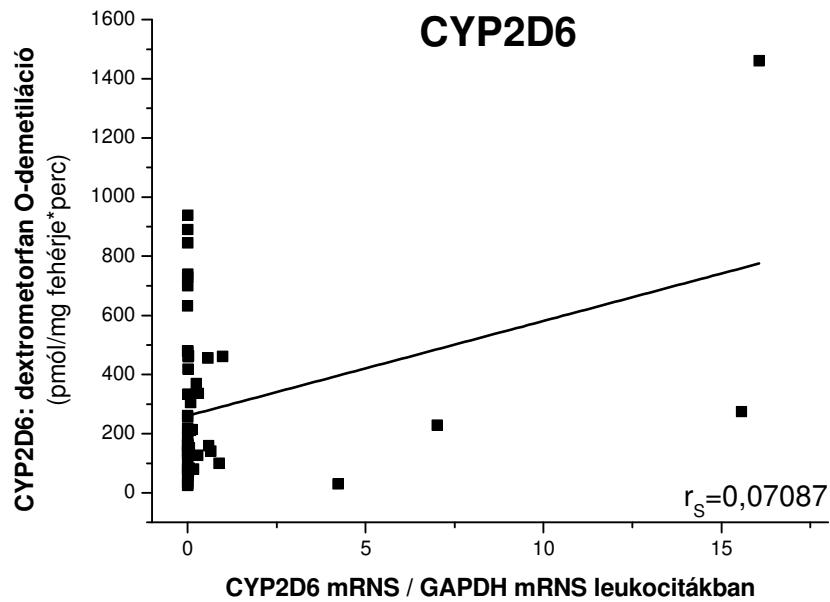
11/b ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP2B6 mRNS szintek és a máj CYP2B6 enzimaktivitása közti korreláció.



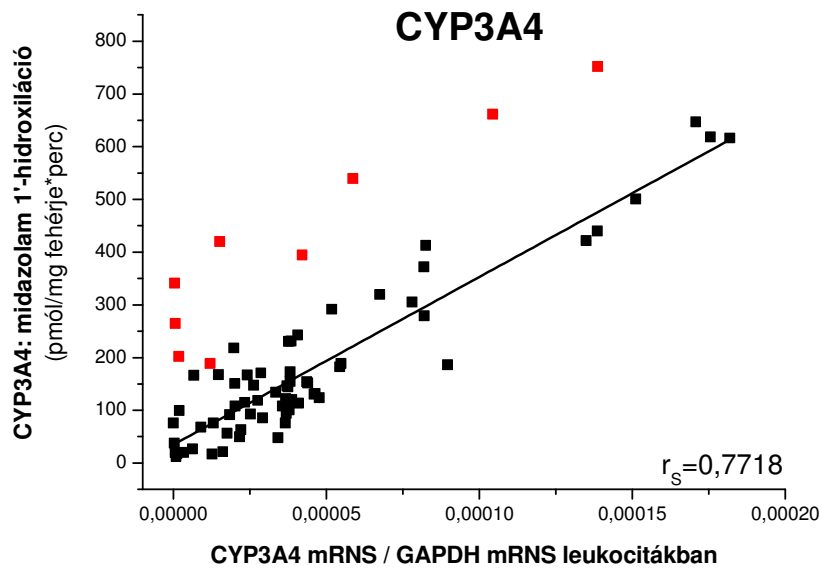
11/c ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP2C9 mRNS szintek és a máj CYP2C9 enzimaktivitása közti korreláció.



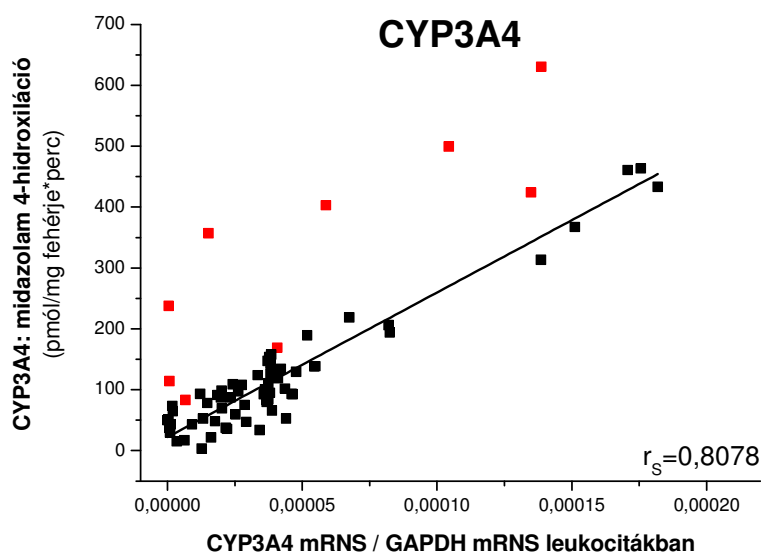
11/d ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP2C19 mRNS szintek és a máj CYP2C19 enzimaktivitása közti korreláció.



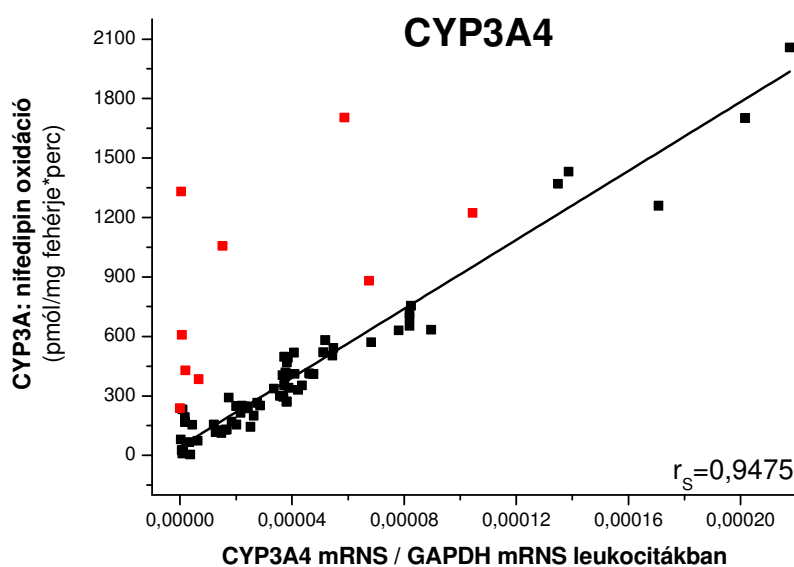
11/e ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP2D6 mRNS szintek és a máj CYP2D6 enzimaktivitása közti korreláció.



11/f ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP3A4 mRNS szintek és a máj CYP3A4 enzimaktivitása (midazolam 1'-hidroxiláció) közti korreláció.



11/g ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP3A4 mRNS szintek és a máj CYP3A4 enzimaktivitása (midazolam 4-hidroxiáció) közti korreláció.



11/h ábra: A leukocitákban mérhető relatív CYP3A4 mRNS szintek és a máj CYP3A4 enzimaktivitása (nifedipin oxidáció) közti korreláció.

18. táblázat: A máj CYP enzimaktivitásai, valamint a májban és a leukocitákban lévő CYP expresszió közti összefüggések. A Spearman-féle korrelációs koefficiensek (r_s), a 95 %-os konfidencia intervallumok, valamint a valószínűségi változók (P) meghatározása.

CYP aktivitás		CYP mRNS	
		májban	leukocitákban
CYP1A2		CYP1A2 mRNS	
fenacetin O-dealkiláz	r _S 95% CI P	0,8780 0,8058 – 0,9245 < 0,0001	0,8896 0,7868 – 0,9443 < 0,0001
CYP2B6		CYP2B6 mRNS	
mefenitoin N-demetiláz	r _S 95% CI P	0,8900 0,8342 – 0,9278 < 0,0001	-0,1824 -0,4178 – 0,07595 0,1525
CYP2C9		CYP2C9 mRNS	
tolbutamid 4-hidroxiláz	r _S 95% CI P	0,9255 0,8858 – 0,9518 < 0,0001	0,9179 0,8703 – 0,9485 < 0,0001
CYP2C19		CYP2C19 mRNS	
mefenitoin 4'-hidroxiláz	r _S 95% CI P	0,8808 0,8160 – 0,9237 < 0,0001	0,8018 0,6792 – 0,8679 < 0,0001
CYP2D6		CYP2D6 mRNS	
dextrometorfan O-demetiláz	r _S 95% CI P	0,9130 0,8532 – 0,9491 < 0,0001	0,07087 -0,1939 – 0,3260 0,5905
CYP3A		CYP3A4 mRNS	
nifedipin oxidáz	r _S 95% CI P	0,8984 0,8436 – 0,9346 < 0,0001	0,9475 0,9145 – 0,9680 < 0,0001
CYP3A		CYP3A4 mRNS	
midazolam 1'-hidroxiláz	r _S 95% CI P	0,8112 0,7165 – 0,8765 < 0,0001	0,7718 0,6484 – 0,8557 < 0,0001
CYP3A		CYP3A4 mRNS	
midazolam 4-hidroxiláz	r _S 95% CI P	0,8001 0,7005 – 0,8783 < 0,0001	0,8078 0,7005 – 0,8794 < 0,0001

5.6. A gyógyszer-lebontó képesség minősítése: gyenge, átlagos és extenzív metabolizáló fenotípusú csoportok elkülönítése a 'cut-off' értékek alapján

A donorok gyógyszer-metabolizáló kapacitását három fenotípus csoportba (gyenge, átlagos és extenzív metabolizáló) soroltuk be. A 164 donor májszövetében mért CYP aktivitások gyakorisági eloszlásából meghatároztuk az első és harmadik kvartilist, amelyek alapján megállapíthatók a gyenge – átlagos, valamint az átlagos – extenzív metabolizálók közti határértékek (16. táblázat). Szoros korreláció figyelhető meg a májban mérhető CYP enzimaktivitások és májban kimutatható CYP mRNS szintek között. Így májbiopsziából mérhető CYP expresszió alapján jól becsülhető a betegek gyógyszer-lebontó képessége. A gyenge, átlagos és extenzív metabolizáló betegek elkülönítése így nemcsak a máj CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimaktivitásai alapján meghatározott 'cut-off' értékek szerint történhet, hanem a máj CYP mRNS szintjei alapján számított határértékei szerint is minősíthető a betegek gyógyszer-lebontó képessége (19. táblázat).

Leukocitákban a CYP2B6 és CYP2D6 expresszió nem mutatott korrelációt a máj enzimaktivitásaival, ezért a leukocitákat nem tekintjük alkalmasnak arra, hogy a máj CYP2B6, illetve CYP2D6 aktivitásait becsüljük. Azonban szoros összefüggést találtunk a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 leukocitákban mérhető expressziója és a máj enzimaktivitásai között. Ennek alapján a máj CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 aktivitásaira következtethetünk a leukocitákban mérhető CYP mRNS szintekből. A máj CYP enzimaktivitásai alapján kalkulált 'cut-off' értékekből kiszámítottuk a leukociták CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS szintjeire vonatkozó határértékeket, amely a klinikumban is egyszerűen alkalmazható módszert jelent a gyógyszer-metabolizáló képesség meghatározására (19. táblázat).

19. táblázat: A gyógyszer-metabolizáló képesség minősítése májban és leukocitákban mérhető CYP mRNS szintek alapján

CYP	Cut-off értékek	
	PM-IM*	IM-EM*
CYP1A2 - máj leukociták	$4,5 \cdot 10^{-2}$ 10^{-4}	$1,5 \cdot 10^{-1}$ $2 \cdot 10^{-3}$
CYP2B6 - máj leukociták	$3,5 \cdot 10^{-2}$ -	$1,5 \cdot 10^{-1}$ -
CYP2C9 - máj leukociták	$1,5 \cdot 10^{-1}$ $5 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-1}$ $2,5 \cdot 10^{-5}$
CYP2C19 - máj leukociták	$8 \cdot 10^{-2}$ 10^{-6}	$3,5 \cdot 10^{-1}$ 10^{-5}
CYP2D6 - máj leukociták	$1,5 \cdot 10^{-1}$ -	$5 \cdot 10^{-1}$ -
CYP3A4 - máj leukociták	$2,5 \cdot 10^{-1}$ 10^{-6}	1,5 10^{-4}

*PM: gyenge metabolizáló; IM: átlagos metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló

5.7. CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 allél és genotípus gyakoriságok

Olyan CYP mutációk kimutatása volt a célunk, amelyek csökkent működőképességű, vagy működésképtelen CYP enzim termelődést, illetve teljes enzimhiányt eredményeznek, és ezzel csökkent gyógyszer-lebontó képességhez vezetnek. A kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 génhibák kimutatására módszert dolgoztunk ki, a módszer megbízhatóságát szekvenálással erősítettük meg. A szekvenálás eredményei a mellékletben találhatóak.

Több magyarországi kórházzal és klinikával való együttműködés alapján elvégeztük 319 beteg, illetve májdonor leukocitáiból származó genomiális DNS minták CYP-genotipizálását. A betegek tervezett, vagy már folyamatban lévő gyógyszeres terápiája nem minden esetben igényelte a laboratóriumunkban meghatározható összes CYP génhiba kimutatását, ezért az egyes CYP allél, illetve genotípus gyakoriságokat eltérő betegszámú csoportokon határoztuk meg.

A 20-21. táblázatokban láthatóak az allél, illetve genotípus gyakoriságok %-os arányai a magyar populációban. Saját vizsgálati adataink mellett feltüntettem más kaukázusi populációkban kapott allél gyakoriság értékeket is. A CYP2C9*2 (430 C>T), illetve CYP2C9*3 (1075 A>C) génhibák csökkent működőképességű enzimet eredményeznek. A CYP2C9*2 a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktázzal való kapcsolatban, míg a CYP2C9*3 mutáció a szubsztrát felismerésben okoz zavart (1. táblázat). A CYP2C9*3 mutáció egyes CYP2C9 szubsztrátok metabolizmusát befolyásolja. A CYP2C19*2 (681 G>A), CYP2C19*3 (636 G>A), és CYP2D6*4 (1846 G>A) génhibák splicing rendellenességet okoznak és ennek következtében csonka, inaktív enzim expresszálódik. A CYP2D6*3 (2549 delA) és CYP2D6*6 (1795 delT) mutációk 'frameshift'-et okoznak, ami a CYP2D6*3-nál inaktív enzim kifejeződéshez, míg a CYP2D6*6-nál teljes enzimhiányhoz vezet. A CYP3A5*3 génhiba is splicing rendellenességet okoz, ami teljes enzimhiányt eredményez. A CYP3A4 és CYP3A5 enzimek szubsztrátspektruma nagyon hasonló. Mivel a kaukázusi populációban általában nincs jelen a CYP3A5 enzim, azon gyógyszerek esetén, amiket a CYP3A enzimek alakítanak át (pl. takrolimusz, ciklosporin A, karbamazepin) farmakokinetikai problémák jelentkezhetnek azoknál a betegeknél, akiknél a CYP3A5 enzim aktívan expresszálódik. Ugyanis a CYP3A5 enzim aktív működése miatt az átlagos dózissal történő kezelés mellett nem érhető el a kívánt hatást.

Az általunk vizsgált donorok és betegek CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 és CYP3A5*3 allél gyakoriságai hasonlóan bizonyultak más kaukázusi (fehér) populációkban leírt gyakoriságokhoz (20. táblázat) (Zhou et al., 2009; Miners and Birkett 1998; Scordo et al., 2004; de Morais et al., 1994; Gardiner et al., 2006; Ingelman-Sundberg et al., 2005; Thompson et al., 2004).

20. táblázat: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 jelentősebb génhibák allél gyakoriságai a magyar és más kaukázusi populációkban

CYP allélok	Mutáns allél gyakoriság a magyar populációban (%)	Allél gyakoriságok a kaukázusi/fehér populációban (%)
CYP2C9*2	10 (n=638)	8-13
CYP2C9*3	7 (n=638)	7-9
CYP2C19*2	16 (n=626)	9-14
CYP2C19*3	0 (n=626)	< 1

CYP2D6*3	1 (n=416)	2
CYP2D6*4	18 (n=416)	12-21
CYP2D6*6	1 (n=416)	1
CYP3A5*3	96 (n=626)	90-93

21. táblázat: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 jelentősebb génhibák genotípus gyakoriságai a magyar populációkban

CYP allélok	Genotípus	Genotípus gyakoriságok (%)
CYP2C9*2 n=319	Homozigóta vad CYP2C9*1/*1	82
	Heterozigóta CYP2C9*1/*2	17
	Homozigóta mutáns CYP2C9*2/*2	1
CYP2C9*3 n=319	Homozigóta vad CYP2C9*1/*1	85,6
	Heterozigóta CYP2C9*1/*3	14,1
	Homozigóta mutáns CYP2C9*3/*3	0,3
CYP2C19*2 n=313	Homozigóta vad CYP2C19*1/*1	70
	Heterozigóta CYP2C19*1/*2	28
	Homozigóta mutáns CYP2C19*2/*2	2
CYP2C19*3 n=313	Homozigóta vad CYP2C19*1/*1	100
	Heterozigóta CYP2C19*1/*3	0
	Homozigóta mutáns CYP2C19*3/*3	0
CYP2D6*3 n=208	Homozigóta vad CYP2D6*1/*1	98
	Heterozigóta CYP2D6*1/*3	2
	Homozigóta mutáns CYP2D6*3/*3	0
CYP2D6*4 n=208	Homozigóta vad CYP2D6*1/*1	68
	Heterozigóta CYP2D6*1/*4	29
	Homozigóta mutáns CYP2D6*4/*4	3

CYP2D6*6 n=208	Homozigóta vad CYP2D6*1/*1	98
	Heterozigóta CYP2D6*1/*6	2
	Homozigóta mutáns CYP2D6*6/*6	0
CYP3A5*3 n=313	Homozigóta vad CYP3A5*1/*1	0,6
	Heterozigóta CYP3A5*1/*3	7,7
	Homozigóta mutáns CYP3A5*3/*3	91,7

5.8. A gyenge, átlagos és extenzív metabolizáló fenotípus gyakorisága

A leukocitákban meghatározható CYP expresszió alapján jellemeztük a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, és CYP3A4 enzimek aktivitását és minősítettük 137 magyarországi beteg gyógyszer-metabolizáló képességét. A vérminták a 4.2. fejezetben felsorolt kórházakból és klinikákról érkeztek, egyes betegeknél több időpontban is végeztünk CYP-fenotipizálást, mivel a CYP expresszió különböző behatásokra időről-időre változhat. CYP1A2 fenotipizálást a Szent László Kórház Csontvelő Transzplantációs Osztályáról érkező vérminták esetében nem végeztünk, mert a betegek kezelése során nem alkalmaznak olyan gyógyszert, amelynek metabolizmusában a CYP1A2 enzim vesz részt. A Heim Pál Gyermekkorház Madarász utcai kórházából érkező epilepsziás betegek vérmintáiból csak CYP2C9-fenotipizálás történt, ugyanis az epilepszia kezelésére elsőként választható szer, a valproát metabolizmusát elsődlegesen a CYP2C9 enzim katalizálja. A CYP-fenotípus gyakoriságokat összesítve értékeltük, a betegeket nem csoportosítottuk betegség, kor, nem stb szerint.

A 22. táblázatból látható, hogy a betegek nagyobb része a gyenge metabolizáló fenotípusú csoportba tartozik a CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19 enzimek esetében, míg a CYP3A4 enzimet tekintve a betegek zömmel az átlagos metabolizáló fenotípusba sorolhatók. A gyógyszeres terápia során fokozott figyelmet igényelnek a gyenge és extenzív metabolizáló fenotípusú betegek, akiknél szükség lehet a terápia módosítására, dózis csökkentésre, vagy éppen emelésre.

22. táblázat: A gyenge, átlagos, illetve extenzív CYP-fenotípusú betegek aránya

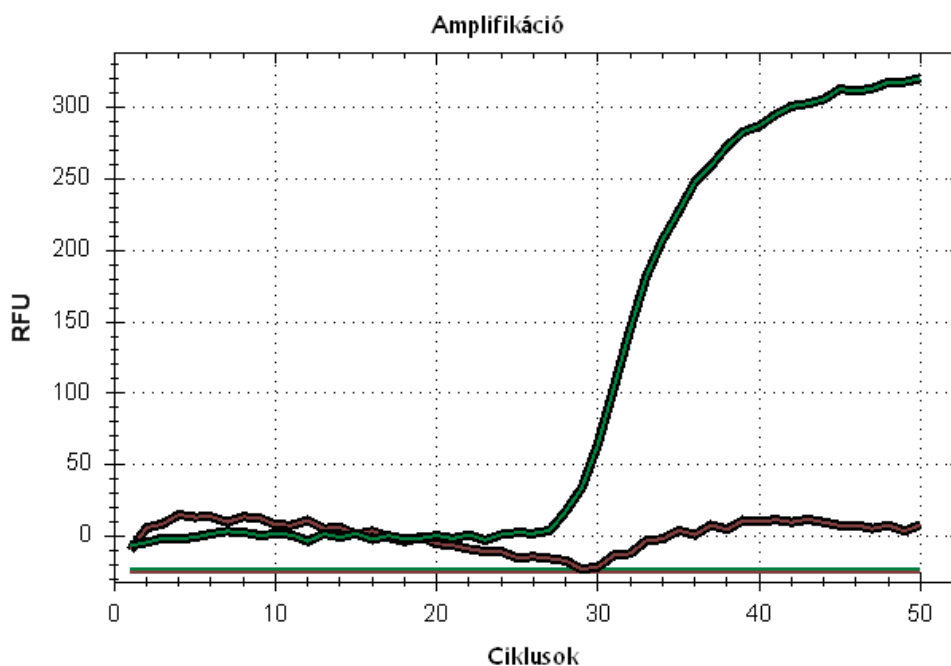
CYP enzimek	Fenotípus	Fenotípus gyakoriságok (%)
CYP1A2 (n= 48)	gyenge	83,1
	átlagos	15,8
	extenzív	1,1
CYP2C9 (n=137)	gyenge	70,1
	átlagos	22,6
	extenzív	7,3
CYP2C19 (n=90)	gyenge	62,1
	átlagos	32,8
	extenzív	5,1
CYP3A4 (n=90)	gyenge	29,9
	átlagos	67,9
	extenzív	2,2

5.9. CYP2C19*2 genotípus meghatározása HRM analízissel

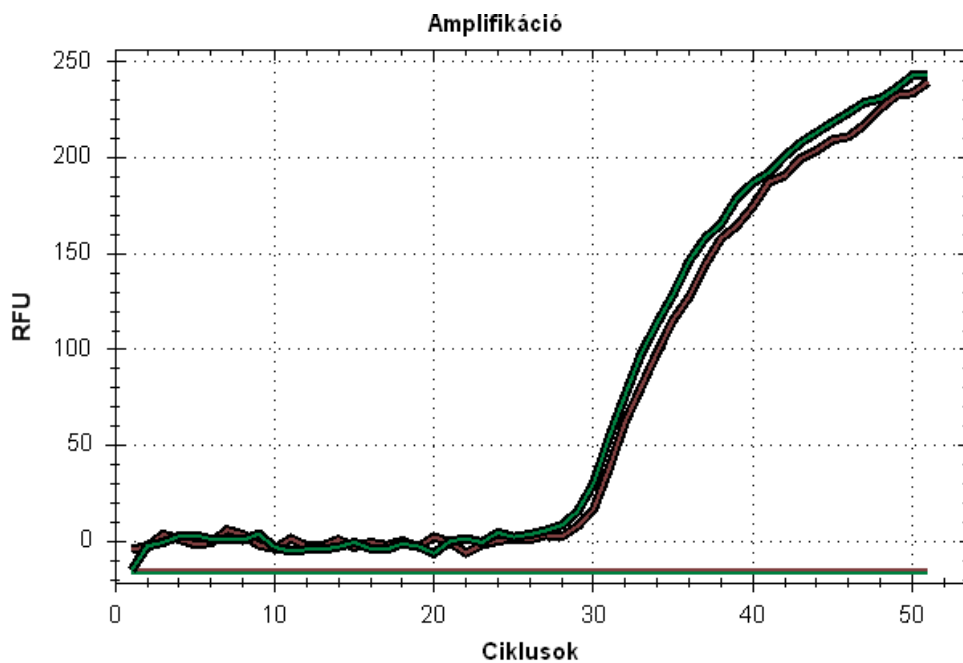
A CYP-genotípus meghatározásokat általában TaqMan próbás hidrolízis SNP analízissel végezzük, ami egy rendkívül érzékeny és megbízható módszernek bizonyult. A metodika hátránya, hogy költséges, fluoreszcens festékekkel jelölt TaqMan próbák használatát igényli. Azért, hogy az SNP meghatározásokat költségkímélőbbé tegyük, a CYP génhibák azonosítására megpróbálkoztunk egy alternatív módszerrel, a HRM analízis alkalmazásával CYP génhibák kimutatására. A HRM analízisnél nem használunk TaqMan próbákat, hanem interkaláló festéket (SYBRGreen I, Eva Green), ami jelentősen olcsóbbá teszi a méréseket. A HRM módszer mérési körülményeit rendkívül gondosan kell meghatározni, ugyanis az interkaláló festék a kettős szálú DNS-hez kötődik, így a rosszul tervezett primerek dimer képződését is jelzi. Az Eva Green festék szemben a leggyakrabban használt SYBRGreen I-el, kevésbé okoz a PCR reakció során gátlást. Ezért az EvaGreen festék jóval magasabb koncentrációban alkalmazható, mint a SYBRGreen I., ami a mérés érzékenységét növeli. Magasabb koncentrációban az EvaGreen telíteni tudja a megfelelő DNS amplikont, ezért a fluoreszcens jel csökkenés jobban detektálható, ami a HRM analízishez megfelelően magas felbontást biztosít. A módszer megbízhatóságának tesztelésére a CYP2C19*2 (G>A csere a CYP2C19 gén 5. exonján) mutáció kimutatása kapcsán összehasonlítottuk a két metodikát, a HRM módszert és a hidrolízis SNP analízist.

Hidrolízis SNP analízis során a vad típusú allélt (CYP2C19*1) Cal FluorGold540 fluoreszcens festékekkel jelölt próbával mutattuk ki (12/a-c ábrák: zöld szín), a mutáns allélt (CYP2C19*2) detektálása Quasar670 festékekkel jelölt próbával történt (12/a-c ábrák: barna

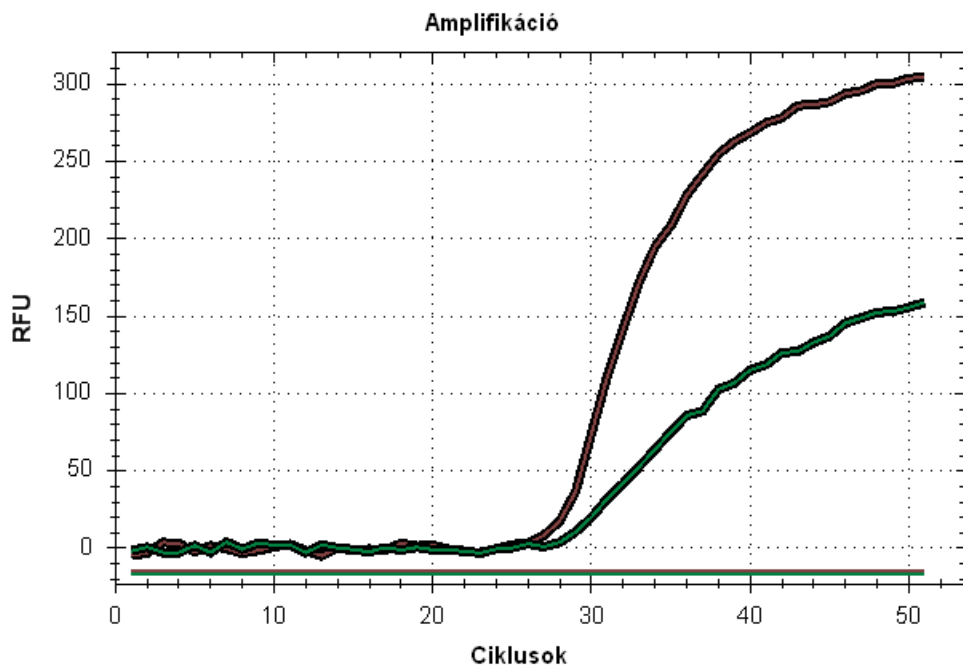
szín). A homozigóta vad genotípus (CYP2C19*1/*1) csak Cal FluorGold540 jelet eredményezett (12/a ábra), míg a heterozigóta CYP2C19*1/*2 genotípusnál mind a Cal FluorGold540, mind a Quasar670 szignál azonos intenzitással jelentkezett (12/b ábra). A homozigóta mutáns genotípusnál (CYP2C19*2/*2) ugyan mindkét fluoreszcencia szignál megjelent, azonban a mutáns allélt jelző Quasar670 fluoreszcencia jel intenzitása lényegesen magasabb volt (12/c ábra). A három genotípus megbízható elkülönítésére az allél diszkriminációs módszert alkalmaztuk, amit a real-time PCR reakció lefutása után a Bio-Rad CFX Manager software-el végeztünk. Az allél megkülönböztetésénél a software ábrázolja a maximális Quasar670 fluoreszcens jel intenzitást a Cal FluorGold540 maximális jelintenzitás függvényében (13. ábra). Látszik a 13. ábrán is, hogy a három genotípus egyértelműen elkülöníthető.



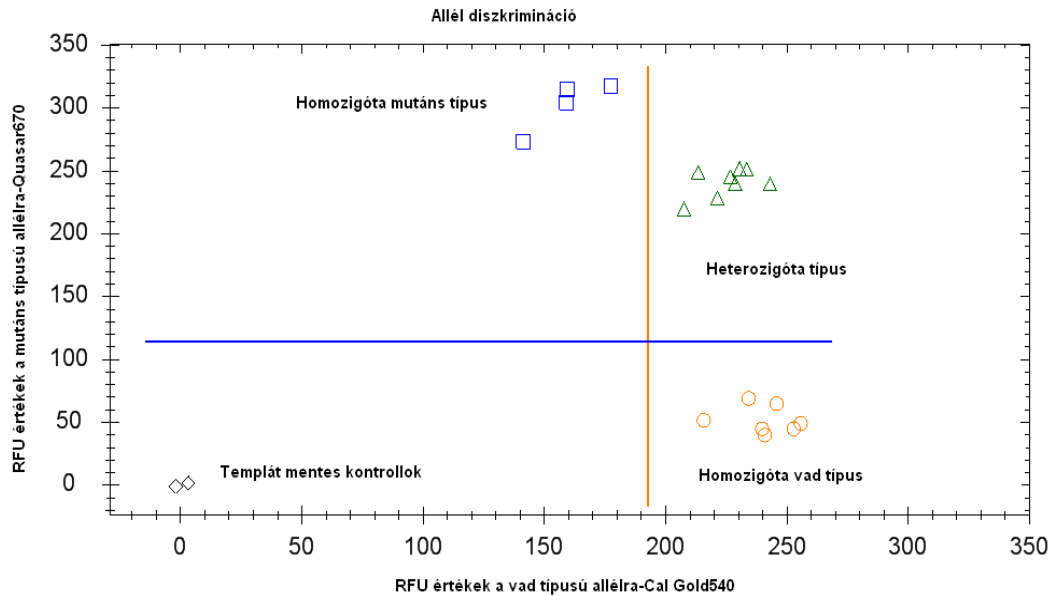
12/a ábra: Homozigóta vad CYP2C19*1/*1 típus vizsgálata TaqMan próbákkal.
zöld: CYP2C19*1 próba; barna: CYP2C19*2 próba



12/b ábra: Heterozigóta CYP2C19*1/*2 típus vizsgálata TaqMan próbákkal.
zöld: CYP2C19*1 próba; barna: CYP2C19*2 próba



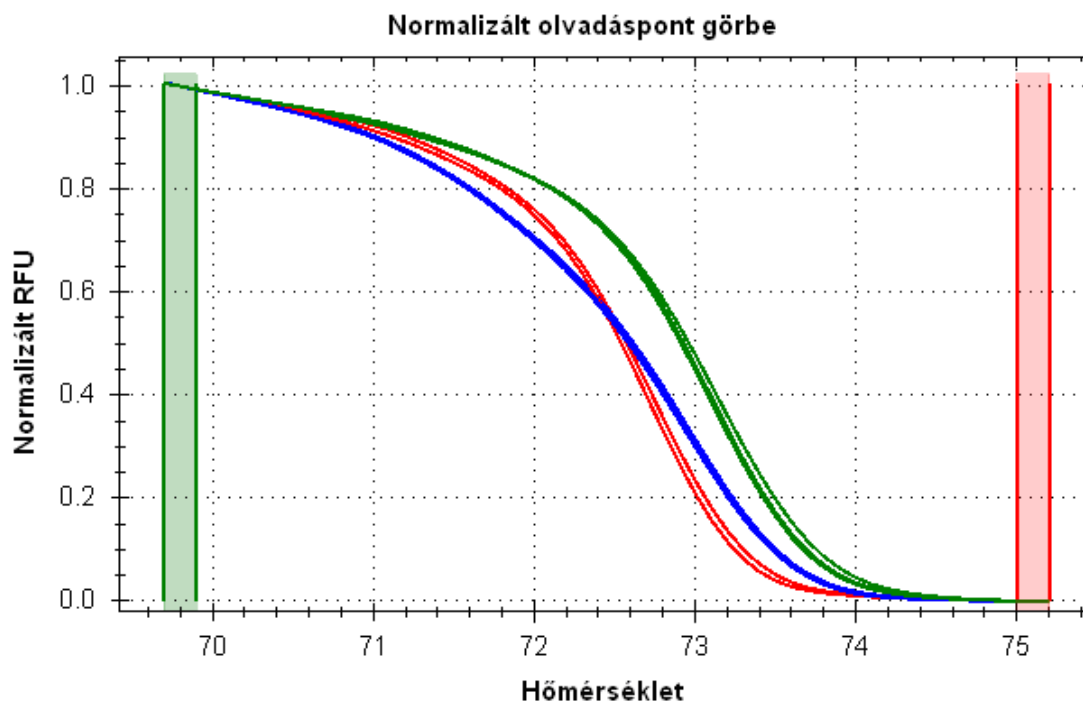
12/c ábra: Homozigóta mutáns CYP2C19*2/*2 típus vizsgálata TaqMan próbákkal.
zöld: CYP2C19*1 próba; barna: CYP2C19*2 próba



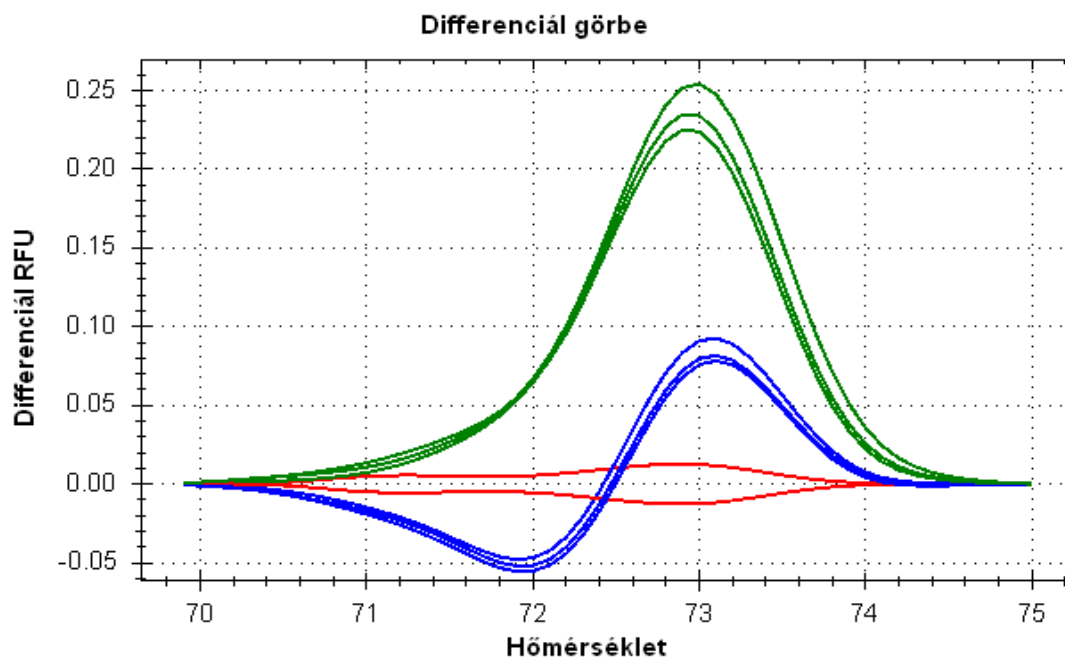
13. ábra: A három CYP2C19 genotípus (CYP2C19*1/*1; CYP2C19*1/*2; CYP2C19*2/*2) elkülönítése allél diszkriminációs módszerrel.

A HRM analízisének alkalmazott HRM software-ek a normalizált fluoreszcenciát ábrázolják a hőmérséklet függvényében (14/a ábra). A DNS minták HRM analízisének CYP2C19 homozigóta vad genotípusú (CYP2C19*1/*1) egyének PCR termékeinek kimutathatóan magasabb az olvadáspontja, mint a homozigóta mutáns genotípusúaké (CYP2C19*2/*2). A heterozigóta genotípusú (CYP2C19*1/*2) egyéneknél pedig a görbe alakja változik meg. A bázis csere miatt ugyanis a DNS ampliconok egyrészt tökéletesen hibridizálnak, másrészt a vad típusú DNS szakasz mutáns típusú DNS szakasszal is összekapcsolódhat (mismatch). Az ilyen módon rosszul hibridizált kettős-szálú DNS szakaszok olvadáspontja alacsonyabb. Ahogy növekszik a hőmérséklet, először a rosszul hibridizált ampliconok válnak szét, ezért kezdetben a heterozigóta olvadási görbe a homozigóta vad, és a homozigóta mutáns görbék alatt található. A hőmérséklet növekedésével azonban már a megfelelően kapcsolódott DNS szakaszok is szétválnak, ezért a heterozigóta olvadási görbe már a homozigóták görbéi között található (14/a ábra). A HRM analízishez a reverse primert újra terveztük, hogy 100 bázispárnál rövidebb amplicont (88 bázispár hosszú) kapjunk. A 100 bázispárnál hosszabb ampliconoknál ugyanis már nehezebb egy bázispár különbséget kimutatni. Összehasonlításképpen elvégeztük a hidrolízis SNP analízishez tervezett primerekkel is a HRM vizsgálatot, ami egy 164 bázispár hosszú amplicont eredményezett. A 88 bázispár hosszú amplicon esetében a normalizált olvadáspont görbén és a differenciál grafikonon egyaránt jól elkülöníthető a három különböző genotípus (14/a-b

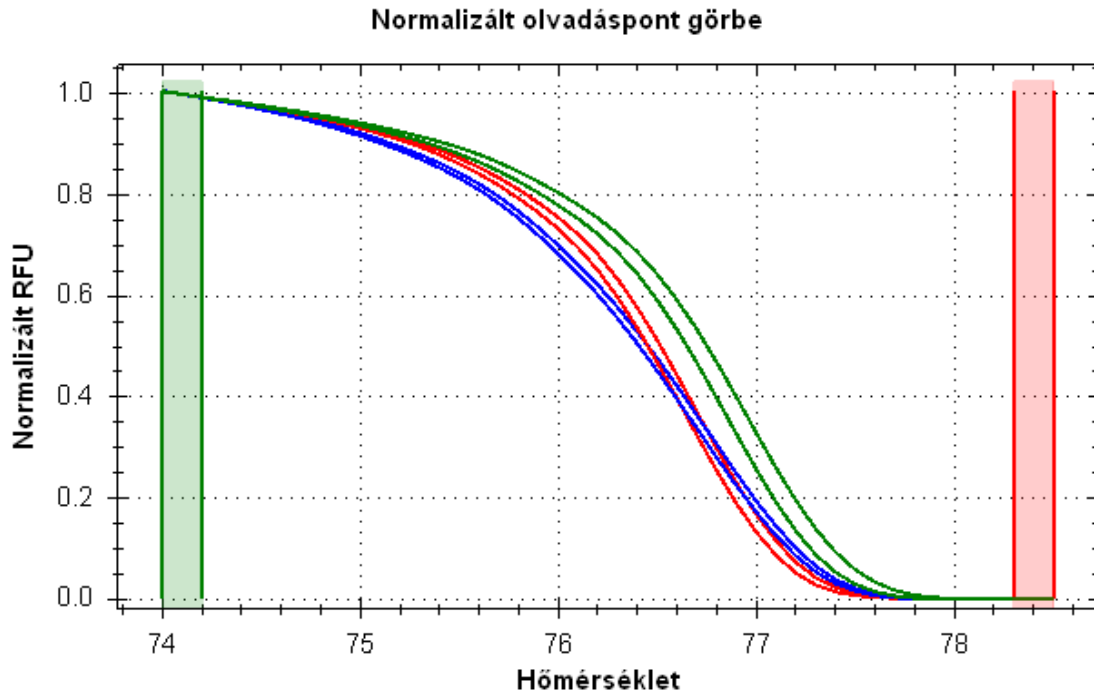
ábrák), míg a 164 bázispár hosszú DNS oligonukleotid esetében a három csoport szétválasztása nehézkes (15/a-b ábrák). Minél rövidebb egy amplikon, annál kisebb olvadáspont különbségek is kimutathatóak. Az ábrákon a zöld a homozigóta vad (CYP2C19*1/*1), a kék a heterozigóta (CYP2C19*1/*2), míg a piros szín a homozigóta mutáns (CYP2C19*2/*2) genotípust jelenti. A homozigóta vad genotípus HRM görbéjén a normalizált fluoreszcens jelhez (RFU) magasabb olvadáspont érték tartozik, mint a homozigóta mutáns, illetve a heterozigóta diagramoknál (14/a, 15/a. ábrák). A különbség grafikonokon a homozigóta mutáns HRM görbét tekintettük nullának és az RFU különbségeket ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében (14/b, 15/b ábrák). Az ábrák készítését a Precision Melt Analysis software-el (BioRad Laboratories) végeztük, ami már $0,1^{\circ}\text{C}$ olvadáspont különbséget érzékel. A software az olvadáspont különbségek alapján, valamint a görbék alakja szerint eltérő csoportba sorolja a különböző genotípusú mintákat. A CYP2C19*1 vad típusú amplikonok a 681. pozícióban egy G nukleotidot tartalmaznak, amely magasabb olvadáspont értéket (73°C) eredményezett, míg a CYP2C19*2 mutáns DNS szakaszok $72,8^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű olvadáspontot eredményeztek. A heterozigóta genotípusú egyének eltérő lefutású HRM görbét adtak a normalizált RFU-hőmérséklet diagramokon. Mindez azt mutatja, hogy a G>A báziscsere a kis olvadáspont különbség ellenére is jól azonosítható.



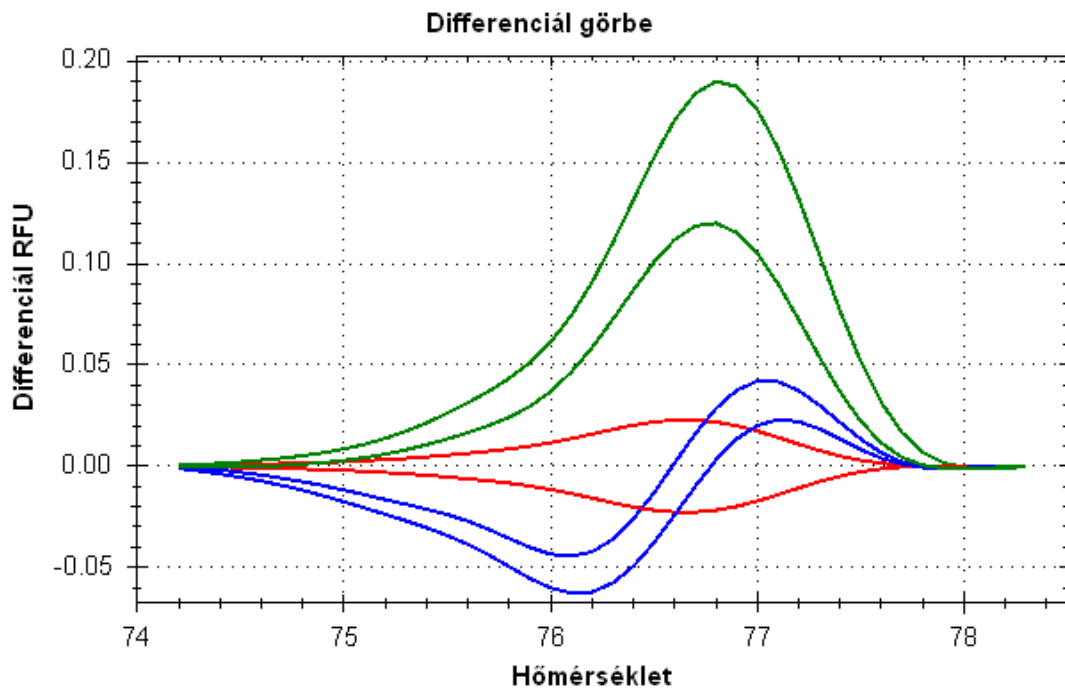
14/a ábra: CYP2C19 genotípus meghatározás HRM analízissel: normalizált olvadáspont görbe 88 bázispár hosszúságú amplicon esetében. Az ábrán a zöld a homozigóta vad (CYP2C19*1/*1), a kék a heterozigóta (CYP2C19*1/*2), míg a piros szín a homozigóta mutáns (CYP2C19*2/*2) genotípust jelenti.



14/b ábra: CYP2C19 genotípus meghatározás HRM analízissel: RFU különbségek a hőmérséklet függvényében a 88 bázispár hosszúságú ampliconnál. Az ábrán a zöld a homozigóta vad (CYP2C19*1/*1), a kék a heterozigóta (CYP2C19*1/*2), míg a piros szín a homozigóta mutáns (CYP2C19*2/*2) genotípust jelenti.

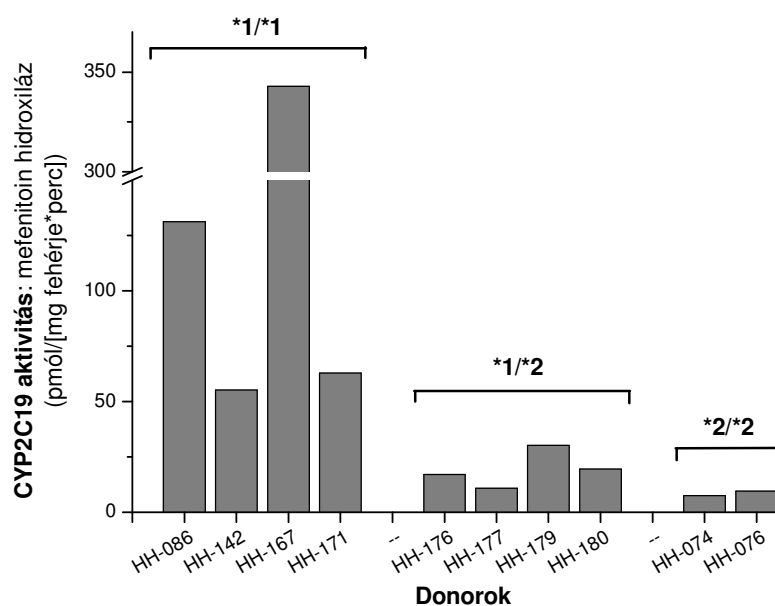


15/a ábra: CYP2C19 genotípus meghatározás HRM analízissel: normalizált olvadáspont görbe a 164 bázispár hosszúságú amplicon esetében. Az ábrán a zöld a homozigóta vad (CYP2C19*1/*1), a kék a heterozigóta (CYP2C19*1/*2), míg a piros szín a homozigóta mutáns (CYP2C19*2/*2) genotípust jelenti.



15/b ábra: CYP2C19 genotípus meghatározás HRM analízissel: RFU különbségek a hőmérséklet függvényében a 164 bázispár hosszúságú amplikonnál. Az ábrán a zöld a homozigóta vad (CYP2C19*1/*1), a kék a heterozigóta (CYP2C19*1/*2), míg a piros szín a homozigóta mutáns (CYP2C19*2/*2) genotípust jelenti.

Májszövetből meghatároztuk a donorok CYP2C19 genotípusát. A két PCR alapú módszer, a hidrolízis SNP analízis, illetve a HRM analízis eredményeit a PCR termékek szekvenálásával igazoltuk. A különböző CYP2C19 genotípus csoportokhoz tartozó donorok máj mikroszómájában meghatároztuk a szelektív CYP2C19 (mefenitoin 4'-hidroxiláz) enzimaktivitásokat. A 16. ábra példaként 10 donor specifikus CYP2C19 enzimaktivitását mutatja. A CYP2C19*1/*2 heterozigóta, és a CYP2C19*2/*2 homozigóta mutáns genotípusú donorok specifikus enzimaktivitás értékei jóval alacsonyabbak voltak, mint a CYP2C19*1/*1 homozigóta vad típusú donorok aktivitásai.



16. ábra: Májszövet donorok CYP2C19 specifikus mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitásai.

5.10. Klinikai példák a CYP-státus alapján kialakított személyre szabott gyógyszeres kezelésre (esettanulmányok)

A Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Laboratórium közreműködésével kifejlesztett diagnosztikai rendszer CYPtestTM néven bejegyzésre került. Néhány klinikai példa kapcsán szeretném bemutatni a több lépcsős diagnosztikai rendszer jelentőségét és

alkalmazását. Ezek a klinikai esetek igazolják, hogy a CYP-genotípus, illetve fenotípus ismeretében módosított gyógyszeres kezelés jelentősen javíthatja a gyógyszerhatékonyt és a betegek életminőségét.

5.10.1. Másfél hónapos újszülött epileptikus tüneteinek sikeres kezelése

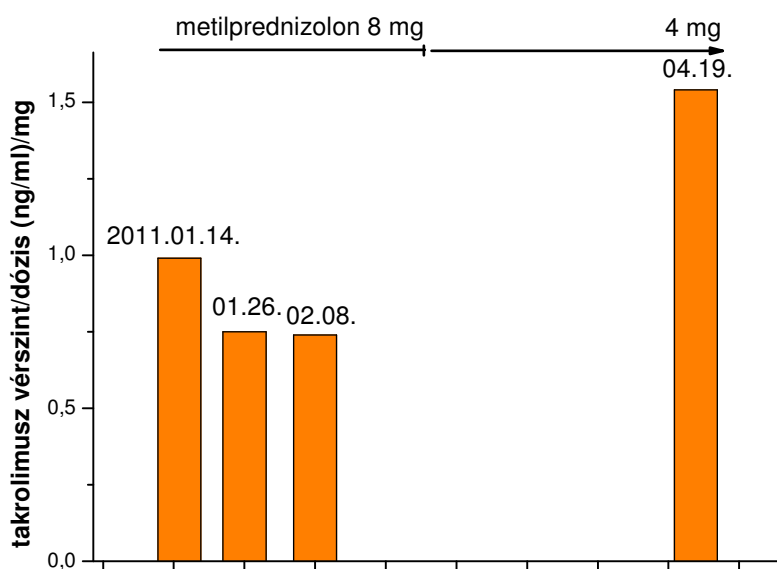
Egy 5 hetes csecsemőnél epilepsiát diagnosztizáltak, az EEG vizsgálat kétoldali konvulzív jeleket mutatott. A kezelőorvos valproát (Convulex) kezelést kezdett a betegnél, folyamatosan növelve az adagot napi 75 mg-ra. A kezelés megkezdését követően két héttel anaemia (vérszegénység), thrombocytopaenia (a véralváadáshoz szükséges vérlemezkék számának csökkenése) jelentkezett a betegnél. A súlyos toxikus tünetek megjelenésével a valproát kezelést leállították, majd a kezelőorvos gyógyszer-mellékhatás gyanúja miatt felkereste laboratóriumunkat. Elvégeztük a teljeskörű CYP genotípus és fenotípus meghatározást, a csecsemőnél CYP2C9*3/*3 homozigóta mutáns genotípust mutattunk ki. A CYP2C9 genotípus alapján megállapítható, hogy a betegnél erősen redukált aktivitású CYP2C9 enzim expresszáldott, amely a valproát lebontásáért és hatástalanításáért felelős. A beteg vérében mért rendkívül magas valproát koncentráció szintén alátámasztotta a gyenge CYP2C9 lebontóképességet és magyarázatul szolgált a súlyos mellékhatások megjelenésére. A valproát kezelés leállítása után alkalmazott alternatív gyógyszereléssel (karbamazepin kezelés) jelenleg tünetmentes a kisgyerek.

5.10.2. Takrolimusz dózis beállításának nehézségei egy szívtranszplantált betegnél

Egy 8 éves, szívtranszplantáción átesett kisfiú immunszuppresszáns terápiájának részeként szokatlanul magas, napi 8 mg takrolimuszt kapott. A takrolimusz szokásos napi dózisa gyermekeknél 2,5 - 4,5 mg. A szívbiopszia azonban ennek ellenére a szerv enyhe kilökődését jelezte. 2011. január 14-én, 26-án és február 8-án HPLC-MS méréssel laboratóriumunkban meghatározott takrolimusz vérszintek (7,91 ng/ml, 6,22 ng/ml, 6,33 ng/ml) alacsonyabbnak bizonyultak, mint a terápiás hatáshoz szükséges koncentráció (10 - 12 ng/ml). A PCR-el megállapított CYP3A5 genotípusa heterozigóta CYP3A5*1/*3. A betegnél tehát az átlagosnak tekinthető európai (kaukázusi) emberrel ellentétben működőképes CYP3A5 enzim expresszáldik, ami a CYP3A4 enzim mellett szintén képes lebontani a takrolimuszt. Irodalomból ismert (Dai et al., 2006), hogy a CYP3A5 enzim még intenzívebben képes metabolizálni a takrolimuszt, mint a CYP3A4. A CYP3A5 genotípus,

illetve a takrolimusz vérszintek ismeretében a dózis fokozatos emelésére volt szükség (8 mg napi dóziszról 8,25 mg majd 8,50 mg-ra).

Az immunszuppresszív terápia másik komponenseként a beteg az átlagos protokoll szerint szteroidot, napi 8 mg metilprednizolont is kapott, amelynek dózisát fokozatosan csökkentették 4 mg-ra. Ismert, hogy a szteroidok indukálják a CYP3A4/5 enzimek expresszióját, és a szteroid dózis csökkentésével az indukció mértéke is csökken. Az április 19-én ismételten meghatározott takrolimusz vérszint 13,1 ng/ml-re emelkedett. Azonos dózisú takrolimusz kezelés mellett tapasztalt vérszint növekedést feltehetően a szteroid (metilprednizolon) dózis csökkentése idézte elő (17. ábra).



17. ábra: A takrolimusz normalizált vérszintjének alakulása

5.10.3. Egy 33 éves nőbeteg alacsony karbamazepin vérszintjének oka

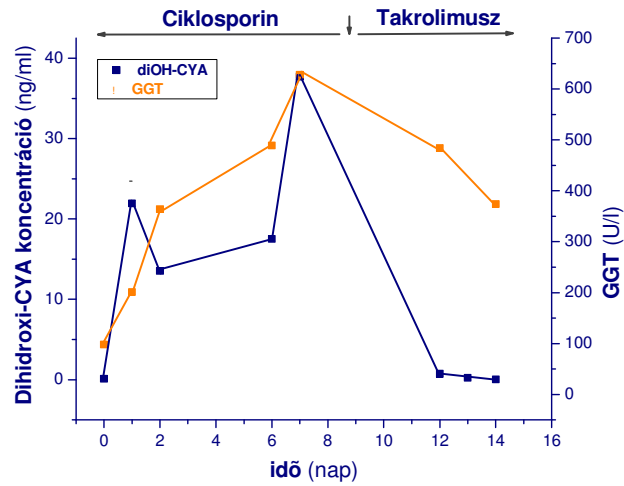
Egy 33 éves, szkizoaffektív zavarok miatt kezelt nőbetegnél a CYP génhibák meghatározása során CYP3A5*1/*3 heterozigóta genotípust mutattunk ki, amely működőképes CYP3A5 enzimfehérje kifejeződését jelenti. A karbamazepin metabolizmusában meghatározó szerepe van a CYP3A enzimeknek. Hasonlóan az előző esethez, a CYP3A5 enzim jelenléte egy fokozott karbamazepin lebontáshoz vezet, mert a CYP3A4 és CYP3A5 enzimek aktivitása összeadódik. Ezért a karbamazepin dózisának emelésére volt szükség az eredményes kezelés eléréséhez. A beteg kezdetben napi 400 mg karbamazepin kezelésben részesült. A beteg vérmintájából HPLC-MS analízissel

meghatároztuk a gyógyszerszintet. A karbamazepin koncentrációja a terápiás tartomány alsó határa alatt mozgott, 4,96 µg/ml értéket mutatott (terápiás tartomány: 6-12 µg/ml). Az alacsony vérszint érték a fokozott CYP3A aktivitásnak köszönhető, ezért a napi dózist 800 mg-ra emelték, amely 7,33 µg/ml vérszintet eredményezett. Azóta a beteg lelkiállapota stabilizálódott, érzelmi kitörések ritkábban fordultak elő, életvitele kiegyensúlyozottabbá vált.

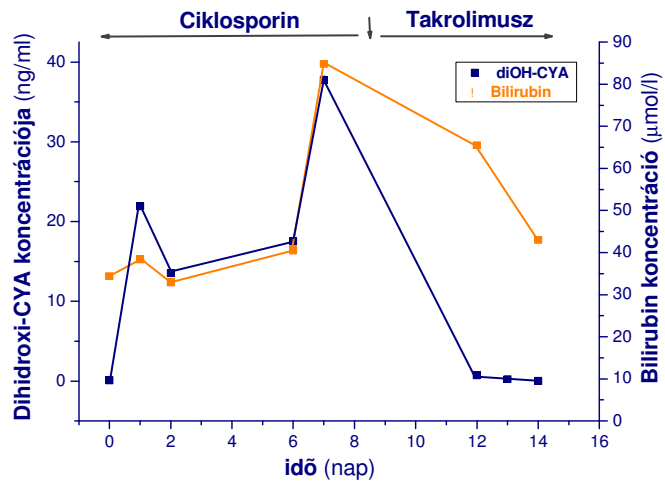
5.10.4. Egy 52 éves férfi immunszuppresszív terápiájának módosítása

A ciklosporin egy, a szervátültetett betegek terápiájában gyakran alkalmazott immunszuppresszáns gyógyszer, ami a T sejt függő immunválasz szelektív és reverzibilis gátlását okozza, egyéb sejtek proliferációját nem befolyásolja. A ciklosporint elsősorban a CYP3A4 enzim metabolizálja. A CYP3A4 enzim a ciklosporint egy toxikus metabolittá, 1,9-dihidroxi-ciklosporinná alakítja át. Az 1,9-dihidroxi-ciklosporin májtoxicitást okoz. Összefüggés mutatható ki az 1,9-dihidroxi-ciklosporin vérkoncentrációja és a vér GGT (gamma-glutamyl transpeptidase), illetve bilirubin szintjei között.

Egy 52 éves férfinál Hepatits B vírus fertőzés miatt máj transzplantációt végeztek. Az átültetésre került máj egy 52 éves donortól származott. Az operációt követően emelt ciklosporin dózissra volt szükség a terápiás vérszint eléréséhez, azonban a kezelés hatására toxikus tünetek (a májenzimek emelkedése) jelentkeztek. A drasztikusan megemelkedett 1,9-dihidroxi-ciklosporin metabolit vérkoncentráció mellett fokozott GGT szint és emelkedett bilirubin szint jelentkezett, ami májtoxicitásra utalt (18-19. ábrák). A donor CYP-státus vizsgálata során kitűnt, hogy jelentősen emelkedett a CYP3A4 expresszió (rendkívül magas mRNS szint volt mérhető), azaz a májdonor az extenzív metabolizáló CYP3A4 fenotípusú csoportba tartozott. A beültetett máj rendkívül intenzíven metabolizálta a ciklosporint, amely magyarázatul szolgál a recipiensnél jelentkező fokozott 1,9-dihidroxi-ciklosporin termelésre. A transzplantációt követő 8. napon takrolimusz kezelésre tértek át, amely a májfunkció jelentős javulását eredményezte az 52 éves máj recipiens férfi esetében (18-19. ábrák).



18. ábra: Összefüggés az 1,9-dihidroxi-ciklosporin (CYA) vérkoncentráció (kék görbe), illetve a vér GGT szintje (narancssárga görbe) között.



19. ábra: Összefüggés az 1,9-dihidroxi-ciklosporin (CYA) vérkoncentráció (kék görbe), illetve a vér bilirubin szintje (narancssárga görbe) között.

6. Az eredmények értékelése

A személyre szabott gyógyszeres terápia kialakításához megbízható diagnosztikai módszerek kidolgozására van szükség a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének megállapításához. A teljes gyógyszer-metabolizmus nehezen becsülhető, de némi egyszerűsítéssel információ nyerhető a gyógyszer-lebontó kapacitásról. Egyrészt a gyógyszer-lebontásban résztvevő enzimek főként a májban fejeződnek ki, másrészt a testidegen anyagokat főleg a CYP enzimrendszer, közülük is elsősorban a CYP1-3 család tagjai (pl.: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, és CYP3A enzimek) metabolizálják (Chen et al., 2011). A gyógyszer-lebontó képesség megállapításához egy összetett, több lépcsős diagnosztikai eljárást (CYPtestTM) dolgoztunk ki, amivel egyrészt információt kapunk a máj endoplazmás retikulumában kifejeződő CYP enzimek aktivitásáról a májban, illetve vérben történő CYP expresszió (mRNS mennyiség) meghatározásával, valamint a *CYP* génekben levő mutációkról. A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének minősítése és a személyre szabott gyógyszeres terápia kialakítása jelentős mértékben hozzájárul a sikeres gyógyszeres kezeléshez, hiszen javítja a gyógyszerhatékonyt és csökkenti a káros mellékhatások megjelenését.

A máj biopszia ugyan bizonyos esetekben lehetséges az egyes vizsgálatokhoz, de viszonylag kockázatos beavatkozás, ezért célszerűbb a vizsgálatokat lehetőség szerint vérmintából elvégezni. A vér alakos elemeinek zömét a vörösvértestek alkotják, érésük során a sejtmag kilökődik, ezért a vörösvértestek már nem képesek aktív RNS szintézisre. Ennek ellenére bizonyított, hogy a vörösvértestek jelentős RNS tartalommal rendelkeznek (Kabanova et al., 2009), ami alátámasztja azt a feltételezést, hogy a fehérje szintézis a vörösvértestekben sejtmagtól függetlenül történik. Ebből adódóan az érett vörösvértestekben teljes mértékben hiányzik a gén expresszió transzkripció szabályozása. Következésképpen a vörösvértestekben a különböző gének expressziója, mRNS mennyisége csak a sejtmag kilökődése előtti állapotot mutatja, a későbbiekben külső hatásokra bekövetkező transzkripció szabályozás már nem történik. Ezért az eritrociták nem alkalmasak a CYP expressziós vizsgálatokra, azonban a leukociták megfelelőek lehetnek. Az érett fehérvérsejtek sejtmaggal rendelkeznek és aktív RNS szintézis folyik bennük. Ezzel kapcsolatban több kérdés is felmerült bennünk: i) a *CYP* gének fehérvérsejtekben történő expressziója megfelelően tükrözi-e az egyes CYP aktivitásokat a májban; ii) a CYP kifejeződés szabályozása a leukocitákban és a hepatocitákban vajon azonos módon történik-e; iii) a

leukocitákból lehetséges-e információt nyerni a máj gyógyszer-lebontó kapacitására vonatkozóan. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a CYP mRNS mennyiségeket leukocitákban és máj szövetben egyaránt és összefüggéseket állapítsunk meg a CYP expresszió, valamint a májban levő CYP enzimaktivitások között.

A gyógyszer-metabolizáló képesség megállapításának alapvető módszere a CYP enzimek aktivitásának meghatározása szelektív szubsztrátok alkalmazásával (Yuan et al., 2002). A mikroszómális CYP enzimaktivitások meghatározása megbízható módszernek tekinthető, hátránya azonban, hogy jelentős mennyiségű májszövet szükséges hozzá, ezért betegeken nem is végezhető el. Leukocitákban a CYP enzimfehérjék csak rendkívül alacsony szinten fejeződnek ki, ezért az enzimaktivitások itt nem határozhatóak meg és a máj-vér enzimaktivitás korreláció nem végezhető el. Mivel a gének expressziója során az első lépés a mRNS szintézis és ezt követi az enzimfehérje szintézise, ezért feltételezhető, hogy a májban, illetve a leukocitákban a mRNS és enzimfehérje mennyisége és végül az enzimaktivitás összefüggésben van. Ha az összefüggés szoros, akkor a CYP mRNS mennyisége alapján következtethetünk a májban levő enzimaktivitásra. Ezért megvizsgáltuk a gyógyszer-metabolizmusban legfontosabb szerepet játszó hat CYP enzim (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, és CYP3A4) aktivitását a májban, illetve mRNS szintjét a májban és a leukocitákban.

A CYP enzimek specifikus enzim aktivitásait HPLC-UV-vel, illetve HPLC-MS-el, a CYP mRNS mennyiségeket leukocitákban és májszövetben kvantitatív real-time PCR technikával határoztuk meg 164 humán májdonornál. A májban a különböző donorok CYP enzimaktivitásai nagyfokú variabilitást mutattak, amit más szerzők is leírtak már (Transon et al., 1996; Blanco et al., 2000; Shu et al., 2001). A májban levő CYP mRNS variabilitás hasonló mintázatot mutatott, mint az enzim aktivitásokban mutatkozó különbségek. 20-2.000-szeres különbségeket is tapasztaltunk például a CYP2D6, illetve CYP3A4 expresszió esetében. Az összes vizsgált CYP mRNS a májban detektálható volt szemben az enzimaktivitásokkal, amelyek néhány esetben értékelhetetlenül alacsonyak voltak. Leukocitákban a vizsgált *CYP* gének expressziója szintén a detektálható és értékelhető tartományban volt ellentétben más szerzők által leírtakkal. Koch és mtsainak (2002) nem sikerült CYP3A4 mRNS expressziót kimutatni leukocitákban, míg Furukawa és mtsai (2004) egyáltalán nem detektáltak CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 mRNS-t a perifériás vérésejtekben. A negatív eredmények hátterében feltehetően a nem megfelelő mintavétel, vagy tárolási, metodikai problémák, illetve nem megfelelő primer/próba tervezés állhatott. A detektálási nehézségek oka lehet egyrészt a nem megfelelő RNS izolálási technika, másrészt a

nem elég érzékeny analitikai módszer. Furukawa és mtsai (2004) QUIAGEN (Hilden, Germany) miniprep kit-et alkalmaztak az RNS kinyerésére, míg Koch és munkatársai (2002) az RNS-t RNeasy kit-el (QUIAGEN) izolálták limfocitákból. Mindkét reagenssel nagy tisztaságú RNS állítható elő, de saját tapasztalataink szerint rendkívül rossz hatásfokkal izolálható a CYP mRNS a sejtekből. Akkor alkalmazhatóak az említett RNS izoláló reagenssek, ha a kinyerni kívánt mRNS nagy mennyiségben expresszálódik az adott sejtekben, szemben a TRIzol (Invitrogen), illetve TRI reagenssel (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), amik alkalmasak kis mennyiségű mRNS kinyerésre is. A magyarországi májdonoroknál a *CYP* gének relatív expressziója lényegesen alacsonyabb volt a fehérvérsejtekben, mint a májban (10^2 - 10^4 -szeres különbségek). Másrészt leukocitákban a CYP mRNS-ek variabilitása szintén nagyfokú volt.

Összefüggést kerestünk a máj specifikus CYP enzim aktivitásai és a májban mérhető CYP mRNS mennyiségek között, hogy megállapítsuk, vajon a *CYP* gén expresszió mértéke májban megbízható információt ad-e az enzim aktivitásáról. Szoros korrelációt ($r_s > 0,87$) tapasztaltunk a CYP1A2 mRNS-szint és a fenacetin O-dealkiláció között, ami azt jelenti, hogy a CYP1A2 gén májban történő kifejeződése tükrözi a máj CYP1A2 aktivitását. Hasonló megállapításokat tettek Rodriguez-Antona és mtsai (2001), valamint George és mtsai (1995): összefüggést fedeztek fel a májban levő CYP1A2 mRNS-szint és a 7-metoxirezorufin O-demetiláz aktivitás, illetve a CYP1A2 fehérje mennyiség között. Vizsgálatainkban 164 humán máj donor esetében szintén összefüggést mutattunk ki a májban levő CYP2B6 mRNS-szintek és a mefenitoin N-demetiláz aktivitások között ($r_s = 0,89$), míg Rodriguez-Antona és mtsai (2001) gyengébb korrelációt írtak le a máj CYP2B6 mRNS-szintje és a benzoxirezorufin O-debenziláz aktivitások között 12 humán májmintában ($r = 0,52$). A benzoxirezorufin O-debenzilációt azonban nemcsak a CYP2B6, hanem a CYP3A4 is katalizálja (Niwa et al., 2003), ami magyarázatul szolgálhat a Rodriguez-Antona és mtsai (2001) cikkében leírt gyengébb korrelációra.

A CYP2C9, a CYP2C19, a CYP2D6 és a CYP3A4 enzimek viszonylag gyenge korrelációt mutattak, ha a májban levő CYP enzim aktivitásokat és mRNS mennyiségeket összehasonlítottuk mind a 164 donornál. A genetikai polimorfizmus gyengébben működő enzimeket eredményez, illetve az enzimaktivitás teljes elvesztéséhez is vezethet (lásd 2. fejezetben), ami magyarázatul szolgál bizonyos donoroknál a májban mérhető magasabb mRNS szintekre és alacsonyabb enzim aktivitás értékekre a CYP2C9, CYP2C19 és CYP2D6 esetében. Elsőként tehát szükséges megvizsgálni ezen *CYP* gének leggyakoribb mutációit, majd ezután elvégezni a korrelációs analízist a máj CYP mRNS szintjei és enzimaktivitásai

között. Azokat a donorokat, akiknél CYP génhibákat észleltünk (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4 és CYP2D6*6 mutációt hordozó heterozigóta, vagy homozigóta mutáns genotípusú donorok), kizártuk a korrelációs analízisből. A korreláció szorosnak mutatkozott ($r_s > 0,88$) a CYP2C9, CYP2C19 és CYP2D6 esetében, miután az elemzésbe nem vontuk be a mutációval rendelkező donorokat. George és mtsai (1995) szintén korrelációt állapítottak meg a CYP2C9 mRNS szint és az enzim mennyiség között, de a korreláció mértékét nem találták szorosnak, ami azzal magyarázható, hogy a CYP2C9 fehérje szint mérés során használt antitest feltehetően gyenge szelektivitású volt, így nemcsak a CYP2C9-et detektálták, hanem számos más CYP2C enzimet is. Rodriguez-Antona és mtsai (2001) a máj CYP2C9 mRNS szintje és a diklofenak 4'-hidroxiláz aktivitása között nem találtak összefüggést, bár a szerzők nem vizsgálták a CYP2C9 génhibákat. A fent említett szerzők gyengébb korrelációt találtak a máj CYP2D6 mRNS szintjei és a dextrometorfan O-demetiláz aktivitások között, mint amit mi bemutattunk. Ennek oka szintén az lehet, hogy Rodriguez-Antona és mtsai (2001) figyelemmel kívül hagyták a CYP2D6 génhibákat.

A CYP3A korrelációs vizsgálata során fordított helyzettel szembesültünk: néhány donornál viszonylag magas enzimaktivitásokat (nifedipin oxidáció, midazolam 1'-és 4-hidroxiláció) mértünk, ezzel szemben a májban mérhető CYP3A4 mRNS expresszió alacsonyabb volt a várhatónál. A magyarázatot a CYP3A5 genetikai polimorfizmusa jelentheti. A CYP3A5*3 génhiba a magyar populáció több mint 90 %-ában jelen van mind a két allélon, hasonlóan más európai fehér populációkhoz. A CYP3A5*3 génhiba teljes enzim hiányt okoz, ami azt jelenti, hogy a magyar emberek zöménél (>90 %) egyáltalán nem expresszálódik működőképes CYP3A5 enzim. Amennyiben a viszonylag ritka CYP3A5*1 allél fordul elő a genomban, működőképes CYP3A5 enzim fejeződik ki, ami hozzájárul a legtöbb CYP3A szubsztrát lebontásához, mint például a nifedipin, midazolam, ciklosporin, takrolimusz, eritromicin, karbamazepin és lidokain (Patki et al., 2003; Dai et al., 2006; Huang et al., 2004), vagyis a CYP3A4 és CYP3A5 enzimek aktivitásai összeadódnak. Tapasztalataink szerint azok a donorok, akik CYP3A5 heterozigóták, vagy homozigóta vad genotípusúak (CYP3A5*1/*3 és CYP3A5*1/*1), magasabb CYP3A enzim aktivitás értékeket mutatnak. Ezért a CYP3A5 enzimet aktívan expresszáló donorokat kivettük a korrelációs analízisből, ami egy jóval szorosabb összefüggést eredményezett a máj CYP3A4 mRNS szintje és a CYP3A enzim aktivitások között ($r_s > 0,8$). Korábbi vizsgálatok (Sumida et al., 1999; Rodriguez-Antona et al., 2001) is viszonylag erősebb korrelációt írtak le a máj CYP3A4 mRNS szintje és a tesztoszteron 6 β -hidroxiláz aktivitása között. A CYP3A4

expresszió a májban szintén szoros összefüggést mutatott a normalizált plazma koncentrációval (plazma gyógyszer-szint / dózis * testsúly) a CYP3A szubsztrátok (ciklosporin, takrolimusz) esetében a máj transzplantáltaknál (Thörn et al., 2004).

A máj gyógyszer-metabolizáló kapacitásának becslésére előnyös lenne, ha a metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP enzimek leukocitákban mérhető mRNS mennyiségéből információt kaphatnánk a májban levő CYP enzim aktivitásokról. Az irodalomban azonban eddig még nem jelentek meg ilyen tartalmú közlemények. Több szerző próbálkozott ugyan a máj CYP mRNS szintek és a teljes vérben vagy a perifériás vér mononukleáris sejtjeiben levő CYP mRNS mennyiségek között kapcsolatot találni (Finnström et al., 2001; Nowakowski et al., 2002; Koch et al., 2002; Furukawa et al., 2004; Lee et al., 2010), de széleskörű elemzést ezen a téren még nem végeztek. Finnström és mtsai (2001) nem találtak kapcsolatot a máj CYP mRNS szintje és a vér CYP mRNS mennyiségei között a CYP1A2, illetve a CYP3A4 enzimek esetében, aminek oka lehet, hogy teljes vérből izolálták az RNS-t. Fehérvérsejteknel feltételezhető valamilyen mértékű összefüggés a máj CYP expressziójával, azonban a perifériás vérben lévő sejtek eltérő érettségi állapota, illetve kora nem teszi lehetővé, hogy a vörösvértestek CYP mRNS szintjeiből következtessünk a máj CYP expressziójára. Furukawa és mtsai (2004) nem találtak összefüggést a CYP1A2 májban, illetve vérben történő expressziós szintjei között. A detektálási nehézségek oka lehet még a nem megfelelő RNS izolálási módszer, vagy a nem elég érzékeny analitikai módszer. Lee és mtsai (2010) szintén gyenge korrelációt írtak le a májban és vérben levő CYP mRNS mennyiségek között, de az alacsony mintaszám (n=5) miatt ebből még következtetések kevésbé vonhatók le. Munkánkban igazoltuk, hogy a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 leukocitákban előforduló mRNS mennyiségei erősen korrelálnak a CYP enzimek májban mérhető aktivitásával. Azonban előzetes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A5 genotípus meghatározások voltak szükségesek ahhoz, hogy a genetikai polimorfizmus okozta eltérések ne torzítsák az értékelést. A CYP2C9 és CYP2C19 homozigóta vad, illetve CYP3A5 homozigóta mutáns genotípusú donorok expressziója (májszövetben és leukocitákban egyaránt) híven tükrözte a májban mérhető CYP enzimaktivitásokat. A leukociták CYP2B6 és CYP2D6 mRNS szintjei azonban nem mutattak korrelációt a májban mérhető CYP2B6 és CYP2D6 enzimaktivitásokkal. A CYP2D6 genotípus vizsgálattal ugyan előzetes becslés adható a CYP2D6 génhibák okozta gyenge enzim aktivitásra vonatkozóan, de leukocitákból nem nyújtható információ az enzim aktivitásának aktuális állapotáról abban az esetben, ha az egyén nem hordoz CYP2D6 mutációt. A CYP2D6 enzim genetikai polimorfizmusa jelentős és jelenlegi ismereteink szerint a *CYP2D6* gén nem indukálható, így a CYP2D6 génhibák

meghatározása fontos információt szolgáltat a CYP2D6 szubsztrátok metabolizmusának becsléséhez.

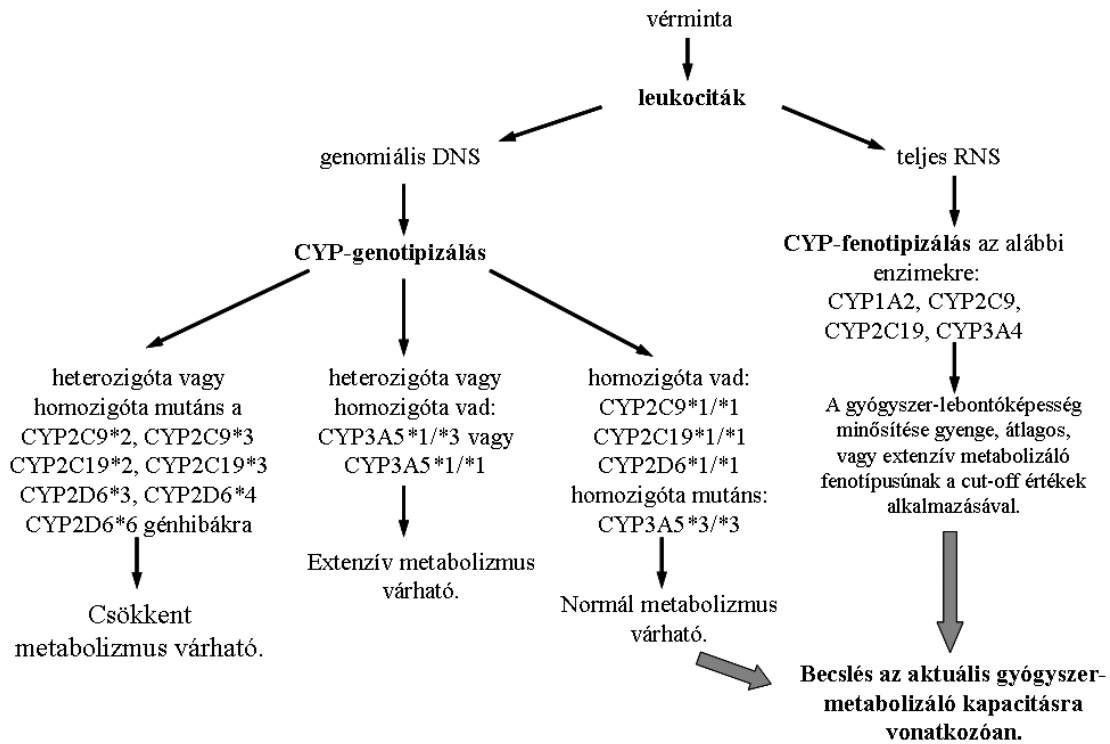
Több magyarországi kórházzal és klinikával való együttműködés alapján elvégeztük 319 beteg, illetve májdonor leukocitáiból származó genomiális DNS minták CYP-genotipizálását. Az allél és genotípus gyakoriságok hasonlóak voltak, mint amit más kaukázusi populációknál már korábban leírtak (Zhou et al., 2009; Miners et al., 1998; Scordo et al., 2004; de Morais et al., 1994; Gardiner et al., 2006; Ingelman-Sundberg et al., 2005; Thompson et al., 2004). A betegek CYP-fenotípus vizsgálata során viszonylag nagy százalékban mutattunk ki gyenge CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 metabolizáló fenotípust. A CYP-fenotípus betegcsoportonkénti elemzése azonban csak magasabb esetszámnál adhat megalapozott eredményt, ezért a CYP-fenotípusok részletesebb értékelésétől tartózkodtunk.

A CYP génhibák kimutatására egy alternatív módszert, az olvadáspont analízist is beállítottuk. A metodikai fejlesztés bemutatására példaként a CYP2C19*2 génhiba (681. pozícióban G>A mutáció) kimutatásánál összehasonlítottuk a HRM és a hidrolízis SNP analízist. A CYP2C19 génhiba megbízhatóan kimutatható volt TaqMan próbás hidrolízis SNP, illetve HRM analízissel egyaránt. Összehasonlítva a két módszer költség-igényét, valamint a kiértékelés egyszerűségét, a HRM módszer előnyösebbnek tekinthető. A HRM analízis anyagköltsége alacsonyabb, ugyanis a PCR reakció elegy nem tartalmaz TaqMan próbákat (hidrolízis SNP analízisnél és a HRM kimutatásnál használt DNS polimeráz enzim keverékek ára közel azonos), ami különösen magas mintaszámnál jelenthet komoly megtakarítást. A TaqMan próbák ára jelenleg 100 PCR reakcióra körülbelül 3.000-8.000,-Ft az oligonukleotidhoz csatolt fluoreszcens festéktől, illetve a kioltó molekulától függően. A HRM analízishez csak primereket kell használni (ára 200-300,-Ft/5 nmól primer), amely különösen előnyös a módszer-fejlesztés során. Ezen felül az oligonukleotidok szintézisét végző laboratóriumok számára a primerek előállítása jóval egyszerűbb és gyorsabb, mint a jelölt próbák szintézise és tisztítása. Az olvadáspont görbék kiértékelése és a genotípus csoportok elkülönítése is egyszerűbb, mint a vad/mutáns allél diszkrimináció. Összességében megállapítható, hogy megfelelően tervezett oligonukleotidokkal és az optimális mérési körülmények beállításával a CYP génhibák kimutatására nemcsak a hidrolízis SNP analízis, de az olvadáspont analízis is alkalmas, sőt számos előnnyel rendelkezik.

7. Következtetések

Munkánkban bemutattuk, hogy a májban lévő CYP enzimaktivitások becsülhetők a CYP-genotipizálás, illetve CYP-fenotipizálás segítségével májból nyert tübiopszia mintából és némi megkötéssel a perifériás vérből izolált leukocitákból is. Elsőként a CYP-genotipizálást célszerű elvégezni, amellyel a *CYP* génekben található, klinikai jelentőséggel bíró mutációk (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6) mutathatók ki máj vagy vérmintából. A CYP-genotipizálással kiszűrhető a génhibák következtében folyamatosan fennálló gyenge (vagy extenzív) metabolizáló fenotípus, így a CYP-genotipizálást elegendő a betegnél egyszer egy életben elvégezni. A CYP-fenotipizálás máj mintából elvégezhető a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimeknél, ami hiteles információt nyújt a felsorolt enzimek májban levő enzimaktivitásáról abban az esetben, ha a *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP2D6* génekben nincs mutáció, és a beteg CYP3A5*3/*3 genotípusú. A vérvétel azonban egy sokkal egyszerűbb mintavételi módszer, és a leukociták bizonyos megkötéssel alkalmasaknak bizonyultak a CYP-fenotipizálásra. A leukocitákban végzett CYP-fenotipizálás a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek esetében nyújt információt a májban levő CYP aktivitásokra azon betegeknél, akik homozigóta vad CYP2C9 illetve CYP2C19 genotípusúak, illetve két CYP3A5*3 mutáns allélt hordoznak (20. ábra).

A betegek gyógyszer-metabolizáló kapacitása tehát minősíthető a CYP-genotipizálás, illetve a CYP-fenotipizálás elvégzésével máj tübiopsziából, illetve némi megkötéssel leukocitákból is. A betegek gyógyszer-metabolizáló kapacitásának becslése segítséget nyújt az egyénre szabott, optimális gyógyszeres terápia beállításához. A CYPtestTM segítségével kiválasztható a leghatékonyabb gyógyszer és meghatározható a megfelelő dózis, amellyel csökkenthető a káros vagy akár végzetes mellékhatások kialakulása, illetve elérhető a megfelelő terápiás hatás, amivel a betegek életminősége jelentősen javítható.



20. ábra: A perifériás vér leukocitáiból történő gyógyszer-metabolizáló kapacitás becslése

8. Tézis pontok

1. A gyógyszer-metabolizáló képesség jellemzésére alkalmas diagnosztikai rendszert dolgoztunk ki, amely egyfelől a gyógyszer-metabolizmusban jelentős szerepet játszó CYP enzimek expressziójának meghatározásán (CYP-fenotipizálás), másfelől a DNS analízissel megállapítható CYP génhibák kimutatásán (CYP-genotipizálás) alapul. A CYPtestTM néven bejegyzésre került eljárás elemei:
 - 1.1. CYP-genotipizálás: A gyógyszer-metabolizmus szempontjából jelentős CYP enzimek génjeiben olyan mutációk kimutatására koncentráltunk, amelyek csökkent működő képességű, vagy teljesen inaktív enzimet eredményeznek, illetve teljes enzimhiányt okoznak. A kaukázusi populációban viszonylag gyakran előforduló CYP polimorfizmusok (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP3A5*3) detektálására alkalmas rendszert dolgoztunk ki.
 - 1.2. CYP-fenotipizálás: Mivel a CYP enzimek expressziója és aktivitása időről-időre változhat, az aktuális gyógyszer-lebontó képesség meghatározása szükséges olyan esetekben, amikor CYP génhiba nem befolyásolja a gyógyszer-metabolizmust. Ezért a gyógyszer-metabolizmus szempontjából fontos CYP enzimek (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4) expresszióját is meghatározzuk, amelyből következtethetünk a máj CYP enzimaktivitásaira.
2. A máj gyógyszer-metabolizáló képességét meghatározó CYP enzimaktivitásokra következtethetünk a májban mérhető CYP mRNS szintekből. Ugyanis szoros összefüggést találtunk a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 májban mért specifikus enzim aktivitásai és expressziója között.
3. A máj gyógyszer-lebontó kapacitását jellemző CYP enzimaktivitásokra bizonyos megkötésekkel következtetni lehet a leukocitákban történő CYP expresszióból is. Ugyanis a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek esetében szoros korrelációt találtunk a leukocitákban mérhető CYP mRNS szintek és a májban levő specifikus CYP enzimaktivitások között. A leukocitákban történő CYP2B6 és CYP2D6 expresszió azonban nem nyújt információt a máj CYP2B6 és CYP2D6 aktivitásairól.
4. Egészségesnek tekinthető donorok májszövetében meghatározott CYP enzimaktivitások gyakorisági eloszlásai alapján meghatároztuk a három gyógyszer-metabolizáló fenotípus csoport (gyenge, átlagos és extenzív metabolizáló) határértékeit. A gyenge – átlagos, valamint az átlagos – extenzív metabolizálók közti határértékek alapul szolgáltak a

gyógyszer-lebontó képesség CYP expresszió alapján történő minősítésére. Májszövetből történő fenotipizálás során a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimek aktivitásaira, míg leukocitákból történő CYP-fenotipizálás során a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek aktivitásaira következtethetünk. A kalkulált 'cut-off' határértékek a klinikumban is egyszerűen alkalmazható módszert kínálnak a gyógyszer-metabolizáló képesség meghatározására.

5. A CYP-genotipizálás és CYP-fenotipizálás eredményeinek együttes értékelésével minősítettük a betegek gyógyszer-lebontó képességét gyenge, átlagos, vagy extenzív metabolizáló fenotípusú csoportba sorolva őket.
6. Több magyarországi kórházzal és klinikával való együttműködés alapján elvégeztük 319 beteg illetve májdonor leukocitáiból származó genomiális DNS minták CYP-genotipizálását és vizsgáltuk a klinikai következményekkel járó CYP génhibák allél és genotípus gyakoriságait. A magyarországi betegek illetve donorok CYP allél és genotípus gyakoriságai hasonlóan bizonyultak a kaukázusi (fehér) populációkra jellemző gyakoriságokhoz.
7. A leukocitákban meghatározható CYP expresszió alapján jellemeztük a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, és CYP3A4 enzimek aktivitását és minősítettük a betegek gyógyszer-metabolizáló képességét. A betegek nagyobb része a gyenge metabolizáló fenotípusú csoportba tartozott a CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19 esetében, míg a CYP3A4 enzimet tekintve zömmel az átlagos metabolizáló fenotípusba voltak sorolhatók.
8. A CYP génhiba meghatározásra szolgáló módszerek megbízhatósága mellett költségminimalizálásra is törekedtünk. A költséghatékonyabb HRM analízis alkalmazhatóságát igazoltuk a CYP2C19*2 (681 G>A) mutáció kimutatásának példáján.

9. Összefoglalás

A gyógyszeres terápia során jelentkező nem-kívánt mellékhatások egy része a gyógyszer-metabolizmus eltéréseiből, vagy megváltozásából fakad. A máj gyógyszer-metabolizáló képességét elsősorban a citokróm P450 (CYP) enzimek mennyisége és aktivitása határozza meg, amely nagyban befolyásolhatja egy adott gyógyszer hatékonyságát és esetleges toxicitását. Megvizsgáltuk, hogy a májban zajló gyógyszer-metabolizmus becsülhető-e a CYP expresszió alapján, azaz a CYP expresszió a májban, illetve a perifériás fehérvérsejtekben mutat-e összefüggést a májban levő CYP enzimaktivitás értékekkel. A CYP-fenotípus megállapítása előtt CYP-genotipizálást végeztünk, meghatároztuk a kaukázusi (fehér) populációban előforduló leggyakoribb CYP génhibákat (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 és CYP3A5*3). A máj CYP enzimaktivitásai és a CYP mRNS szintek közti korreláció meghatározása során kizártuk a működésképtelen *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP2D6*, illetve a működő *CYP3A5*1* alléllal rendelkező donorokat. A májban mért CYP mRNS szintek szoros korrelációt mutattak a máj CYP enzimaktivitásokkal a CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A4 enzimek esetében. A leukociták CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 expressziója szignifikáns összefüggést mutatott a máj CYP enzimaktivásaival. A máj CYP2B6 és CYP2D6 aktivitásai azonban nem becsülhetők a leukociták CYP2B6 és CYP2D6 mRNS szintjei alapján. Így megállapítható, hogy a CYP-genotipizálás és CYP-fenotipizálás eredményeinek együttes értékelésével a betegek gyógyszer-lebontó képessége minősíthető májszövetből, vagy bizonyos korlátozással leukocitákból. A betegek CYP-genotípusának és CYP-fenotípusának ismeretében kiválasztható a kezelésükhöz szükséges hatékony gyógyszer és beállítható a megfelelő dózis, így elkerülhetőek a súlyos, akár végzetes mellékhatások, illetve elérhető a megfelelő terápiás hatás, amivel a betegek életminősége jelentősen javítható.

Meghatároztuk a betegek CYP allél és genotípus gyakoriságait a CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6, CYP3A5*3 génhibák vizsgálatával. Az allél gyakoriságok hasonlóan bizonyultak más kaukázusi (fehér) populációban leírt gyakoriságokhoz. A betegek CYP fenotípus gyakoriságait is értékeltük a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS mennyiségek leukocitákból történő meghatározásával. A betegek nagyobb részénél a leukociták CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19

mRNS szintjei gyenge metabolizáló képességet mutattak, míg a CYP3A4 esetében főleg az átlagos metabolizmus volt a jellemző.

Végül a CYP-genotípus meghatározására alkalmas módszerek közül összehasonlítottuk a hidrolízis SNP analízist az olvadáspont vizsgálattal (HRM). A CYP2C19*2 mutáció (G>A csere a 681. pozícióban) kapcsán bemutattuk, hogy mind a hidrolízis SNP technika, mind a HRM analízis megbízhatóan kimutatja a mutációt. A HRM módszer azonban egy olcsóbb és egyszerűbben értékelhető eljárás, amivel érdemes kiváltani a költségesebb TaqMan próbákat igénylő PCR metodikát.

10. Summary

Many undesired side effects or therapeutic failures of drugs are the results of differences or changes in drug-metabolism, primarily depending on the levels and activities of cytochrome P450 (CYP) enzymes. To assess whether CYP-expression profiles can reflect hepatic drug metabolism, we compared CYP mRNA levels in the liver or peripheral leukocytes with the corresponding hepatic CYP activities. A preliminary CYP-genotyping for the most frequent polymorphisms in Caucasian (white) populations (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 and CYP3A5*3) was carried out before CYP-phenotyping, excluding the donors with non-functional alleles of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6*, and those with a functional *CYP3A5*1* allele from a correlation analysis. The hepatic mRNA levels of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 displayed a strong association with CYP activities in the liver, whereas the expression of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 in leukocytes was proven to reflect the hepatic activities of these CYP species. The leukocytes were found to be inappropriate cells for the assessment of hepatic CYP2B6 and CYP2D6 activities. Combining the results of CYP-genotyping and CYP-phenotyping analyses, patients' drug-metabolizing capacities can be estimated by the CYP-expression in the liver and in leukocytes with some limitations. Patients' genetic and non-genetic variations in CYP status can guide the appropriate selection of drugs and the optimal dose, minimizing the risk of harmful side effects and ensuring a successful outcome of drug therapy.

The patients' and donors' CYP allele and genotype frequencies were determined for the CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 and CYP3A5*3 mutations. All CYP allele frequencies investigated were similar to those of other Caucasian (white) populations. The patients' CYP-phenotype frequencies for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 were also evaluated from CYP mRNA levels in leukocytes. Most of the patients were poor metabolizer for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and intermediate metabolizer for CYP3A4.

Finally, the CYP2C19*2 allele containing G>A mutation at 681. position was successfully detected both by hydrolysis SNP assay and HRM analysis. Comparing the costs and the evaluation simplicity of these two methods, HRM analysis can be considered to be more advantageous.

11. Irodalomjegyzék

Adedoyin A, Prakash C, O'Shea D, Blair IA, Wilkinson GR (1994): Stereoselective disposition of hexobarbital and its metabolites: relationship to the S-mephenytoin polymorphism in Caucasian and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*, 4:27–38.

Andersson T, Weidolf L (2008): Stereoselective disposition of proton pump inhibitors. *Clin Drug Investig*, 28:263–279.

Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazava J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (2001): Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem*, 276: 33101-33110.

Bagshaw SM, Delaney A, Haase M, Ghali WA, Bellomo R (2007): Loop diuretics in the management of acute renal failure: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Resusc*, 9:60–68.

Belpaire FM, Wijnant P, Temmerman A, Rasmussen BB, Brosen K (1998): The oxidative metabolism of metoprolol in human liver microsomes: inhibition by the selective serotonin reuptake inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*, 54:261–264.

Bertilsson L, Henthorn TK, Sanz E, Tybring G, Sawe J, Villen T, (1989): Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype. *Clin Pharmacol Ther*, 45:348–355.

Bhasker CR, Miners JO, Coulter S, Birkett DJ (1997): Allelic and functional variability of cytochrome P4502C9. *Pharmacogenetics*, 7:51-58.

Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Kors JA, Witteman JC, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Stricker BH (2009): Genetic variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower heart rate and blood pressure in beta-blocker users. *Clin Pharmacol Ther*, 85:45–50.

Blanco JG, Harrison PL, Evans WE, and Relling MV (2000): Human cytochrome P450 maximal activities in pediatric versus adult liver. *Drug Metab Dispos*, 28: 379-382.

Bloomer JC, Woods FR, Haddock RE, Lennard MS, Tucker GT (1992): The role of cytochrome P4502D6 in the metabolism of paroxetine by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol*, 33:521–523.

Bohan A and Boyer JL (2002): Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin. Liver Dis.*, 22: 123-136.

Botsch S, Gautier JC, Beaune P, Eichelbaum M, Kroemer HK (1993): Identification and characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in N-dealkylation of propafenone: molecular base for interaction potential and variable disposition of active metabolites. *Mol Pharmacol*, 43:120–126.

Breyer-Pfaff U, Fischer D, Winne D (1997): Biphasic kinetics of quaternary ammonium glucuronide formation from amitriptyline and diphenhydramine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 25:340–345.

Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, and Kadlubar FF (1989): Human cytochrome P-450PA (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.

Carcillo JA, Adedoyin A, Burckart GJ, Frye RF, Venkataramanan R, Knoll C, Thummel K, Roskos L, Wilson JW, Sereika S, Romkes M, Bebia Z, Branch RA (2003): Coordinated intrahepatic and extrahepatic regulation of cytochrome p4502D6 in healthy subjects and in patients after liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther*, 73:456–467.

Chen Q, Zhang T, Wang JF, and Wie DQ (2011): Advances in human cytochrome P450 and personalized medicine. *Curr Drug Metab*, 12: 436-444.

Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ (2001): Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*, 11 (1):1-6.

Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, and Thummel KE (2006): Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*, 34: 836-847.

Davies, NM (1995): Clinical pharmacokinetics of flurbiprofen and its enantiomers. *Clin Pharmacokinet*, 28:100–114.

Dayer P, Gasser R, Gut J, Kronbach T, Robertz GM, Eichelbaum M, Meyer UA (1984): Characterization of a common genetic defect of cytochrome P-450 function (debrisoquine-sparteine type polymorphism)—increased Michaelis Constant (K_m) and loss of stereoselectivity of bufuralol 1'-hydroxylation in poor metabolizers. *Biochem Biophys Res Commun*, 125:374–380.

Dayer P, Leemann T, Striberni R (1989): Dextromethorphan *O*-demethylation in liver microsomes as a prototype reaction to monitor cytochrome P-450 db1 activity. *Clin Pharmacol Ther*, 45:34–40.

Degtyarenko KN and Archakov AI (1993): Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Letters*, 332: 1-8.

de Morais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA (1994): The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*, 269:15419–22.

Ebner T, Meese CO, Eichelbaum M (1995): Mechanism of cytochrome P450 2D6-catalyzed sparteine metabolism in humans. *Mol Pharmacol*, 48:1078–1086.

Ebner T, Eichelbaum M (1993): The metabolism of aprindine in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism. *Br J Clin Pharmacol*, 35:426–430.

Fernandez-Salguero P, Hoffman SMG, Cholerton S, Mohrenweiser H, Raunio H, Rautio A, Pelkonen O, Huang JD, Evans WE, Idle JR (1995): A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. *Am J Human Genetics*, 57: 651-660.

Finnström N, Thörn M, Lööf L, and Rane A (2001): Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol*, 57: 403-409.

Frausto da Silva JJR and Williams RJP (1991): The biological chemistry of the elements. *Clarendon Press, Oxford*

Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Yamane M, Fujii-Kuriyama V (1987): Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P450c gene: similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res.*, 15: 4179-4191.

Funck-Brentano C, Thomas G, Jacqz-Aigrain E, Poirier JM, Simon T, Bereziat G, Jaillon P (1992): Polymorphism of dextromethorphan metabolism: relationships between phenotype, genotype, and response to the administration of encainide in humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 263:780–786.

Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y, and Fukumoto M (2004): Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci*, 95: 520-529.

Furuta T, Shirai N, Takashima M, Xiao F, Hanai H, Sugimura H, Ohashi K, Ishizaki T, Kaneko E (2001): Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther*, 69:158–168.

Furuta T, Sugimoto M, Shirai N, Ishizaki T (2007): CYP2C19 pharmacogenomics associated with therapy of Helicobacter pylori infection and gastro-esophageal reflux diseases with a proton pump inhibitor. *Pharmacogenomics*, 8:1199–1210.

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA (1991): Deletion of the entire Cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *AM. J. Hum. Genet.*, 48: 943-950.

Gage BF, Lesko LJ (2008): Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis*, 25:45–51.

Gardiner SJ, Begg EJ (2006): Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacol Rev*, 58:521–590.

Garfinkel D (1958): Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochem. and Biophysics*, 77: 493-509.

Gellner K, Eiselt R, Huster E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA, Wojnowski L (2001): Genomic organisation of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*, 11:111-121.

George J, Liddle C, Murray M, Byth K, and Farrell GC (1995): Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem Pharmacol*, 49: 873-881.

Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrère N, Maurel P (2001): Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metabolism and Disposition*, 29:242-251.

Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P (2002): Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 4, pp: 209-217.

Gill HJ, Tjia JF, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Back DJ, Park BK (1999): The effect of genetic polymorphisms in CYP2C9 on sulphamethoxazole N-hydroxylation. *Pharmacogenetics*, 9 (1):43-53.

Giraud C, Tran A, Rey E, Vincent J, Treluyer JM, Pons G (2004): *In vitro* characterization of clobazam metabolism by recombinant cytochrome P450 enzymes: importance of CYP2C19. *Drug Metab Dispos*, 32:1279–1286.

Goodstadt L, Ponting CP (2004): Vitamin K epoxide reductase: homology, active site, and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci*, 29:289–292.

Gorman N, Walton HS, Sinclair JF, Sinclair PR (1998): CYP1A-catalyzed uroporphyrinogen oxidation in hepatic microsomes from non-mammalian vertebrates (chick and duck embryos, scup and alligator). *Comp. Biochemistry and Physiology*, 121C: 405-412.

Gray IC, Noble C, Muresu R, Ford S, Spurr NK (1995): A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10. *Genomics*, 28: 328-332.

Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T és Waxman DJ (1986): 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.

Gut J, Catin T, Dayer P, Kronbach T, Zanger U, Meyer UA (1986): Debrisoquine/sparteine-type polymorphism of drug oxidation. Purification and characterization of two functionally different human liver cytochrome P-450 isozymes involved in impaired hydroxylation of the prototype substrate bufuralol. *J Biol Chem*, 261:11734–11743.

Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, Jobin J, Desgagnes P, Poirier P, Allaire J, Dumesnil J, Turgeon J (2000): Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther*, 67:466–477.

Handschin C, Meyer UA (2003): Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, 55: 649-673.

Hazai E, Vereczkey L, Monostory K (2002): Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun*, 291 (4): 1089-1094.

Haritos VS, Ghabrial H, Ahokas JT, Ching MS (2000): Role of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) in the stereospecific metabolism of E- and Z-doxepin. *Pharmacogenetics*, 10:591–603.

Herrlin K, Yasui-Furukori N, Tybring G, Widen J, Gustafsson LL, Bertilsson L (2003): Metabolism of citalopram enantiomers in CYP2C19/CYP2D6 phenotyped panels of healthy Swedes. *Br J Clin Pharmacol*, 56:415–421.

Heyn H, White RB és Stevens JC (1996): Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin. *Drug Metab. Dispos.*, 24: 948-954.

Ho PC, FS Abbot, Zanger UM, Chang TKH (2003): Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *The Pharmacogenetics Journal*, 3: 335-342.

Hoffman SMG, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Mohrenweiser HW (1995): Organization and evolution of the cytochrome P450 CYP2A-2B-2F subfamily gene cluster on human chromosome 19. *J Mol Evol.*, 41: 894-900.

Honkakoski P, Negishio M (2000): Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.*, 347, 321-337 (Printed in Great Britain).

Huang W, Lin YS, McConn DJ, Calamia JC, Totah RA, Isoherranen N, Glodowski M, and Thummel KE (2004): Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos*, 32: 1434-1445.

Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Goldstein JA (1999): A Novel Transversion in the Intron 5 Donor Splice Junction of CYP2C19 and a Sequence Polymorphism in Exon 3 Contribute to the Poor Metabolizer Phenotype for the Anticonvulsant Drug S-Mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther*, 290: 635-640.

Ingelman-Sundberg M (2005): Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects, and functional diversity. *Pharmacogenomics J*, 5:6-13.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007): Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic, and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 116:496-526.

Inomata S, Nagashima A, Itagaki F, Homma M, Nishimura M, Osaka Y, Okuyama K, Tanaka E, Nakamura T, Kohda Y, Naito S, Miyabe M, Toyooka H, (2005): CYP2C19 genotype affects diazepam pharmacokinetics and emergence from general anesthesia. *Clin Pharmacol Ther*, 78:647-655.

Jack ML, Colburn WA (1983): Pharmacokinetic model for diazepam and its major metabolite desmethyldiazepam following diazepam administration. *J Pharm Sci*, 72:1318-1323.

Jakoby WB, Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Schachter DA, Shafritz DA (1994): Detoxication: Conjugation and hydrolysis, The Liver: Biology and Pathobiology. *Raven Press, New York, NY.*, pp 429-442.

Johnson JA, Burlew BS (1996): Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. *Drug Metab Dispos*, 24:350-355.

Kabanova S, Kleinbongard P, Volkmer J, Andree B, Kelm M, and Jax TW (2009): Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci*, 6: 156-159.

Kato R, Yamazoe Y, Yasumori T (1990): Pharmacogenetics and polymorphism of human P-450 which activates and detoxicates xenobiotics and carcinogens. *Princess Takamatsu Symp*, 21:45–53.

Kimber-Trojnar Z, Marciniak B, Leszczynska-Gorzela B, Trojnar M, Oleszczuk J (2008): Glyburide for the treatment of gestational diabetes mellitus. *Pharmacol Rep*, 60:308–318.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ (1989): The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and pseudogene. *Am J Hum Genet*, 45: 889-904.

Kirchheiner J, Heesch C, Bauer S, Meisel C, Seringer A, Goldammer M, Tzvetkov M, Meineke I, Roots I, Brockmoller J (2004): Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 76:302–312.

Klingenberg M (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochem. and Biophysics*, 75: 376-386.

Klotz U (2007): Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet*, 46:985–996.

Knodell RG, Dubey RK, Wilkinson GR, Guengerich FP (1988): Oxidative metabolism of hexobarbital in human liver: relationship to polymorphic S-mephenytoin 4-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther*, 245:845–849.

Kobayashi K, Abe S, Nakajima M, Shimada N, Tani M, Chiba K, Yamamoto T (1999): Role of human CYP2B6 in S-mephobarbital N-demethylation. *Drug Metab Dispos*, 27:1429–1433.

Kobayashi K, Chiba K, Yagi T, Shimada N, Taniguchi T, Horie T, Tani M, Yamamoto T, Ishizaki T, Kuroiwa Y (1997): Identification of cytochrome P450 isoforms involved in citalopram N-demethylation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 280:927–933.

Kobayashi K, Ishizuka T, Shimada N, Yoshimura Y, Kamijima K, Chiba K (1999): Sertraline N-demethylation is catalyzed by multiple isoforms of human cytochrome P450 in vitro. *Drug Metab Dispos*, 27:763–766.

Kobayashi K, Morita J, Chiba K, Wanibuchi A, Kimura M, Irie S, Urae A, Ishizaki T (2004): Pharmacogenetic roles of CYP2C19 and CYP2B6 in the metabolism of R- and S-mephobarbital in humans. *Pharmacogenetics*, 14:549–556.

Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Nuehaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L (2002): Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*, 30: 1108–1114.

Kroemer HK, Fischer C, Meese CO, Eichelbaum M (1991): Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)- propafenone for cytochrome P450IID6-catalyzed 5-hydroxylation: in vitro evaluation of the mechanism. *Mol Pharmacol*, 40:135–142.

Kronbach T, Mathys D, Gut J, Catin T, Meyer UA (1987): 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.

Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer U (1989): Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol. Pharmacol.*, 36: 89-96.

Lasker JM, Wester MR, Aramsombatdee E, Raucy JL (1998): Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylations. *Arch Biochem Biophys*, 353:16–28.

Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA (2003): Differences in flurbiprofen pharmacokinetics between CYP2C9*1/*1, *1/*2, and *1/*3 genotypes. *Eur Clin Pharmacol*, 58:791–794.

Lee CY, Lai TY, Wu YM, Hu RH, Lee PH, Hsu LC, and Tsai MK (2010): Gene expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4 in peripheral blood mononuclear cells and correlation with expression in liver. *Transplant Proc*, 42: 834-836.

Lennard MS, Silas JH, Freestone S, Trevethick J (1982): Defective metabolism of metoprolol in poor hydroxylators of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol*, 14:301–303.

Lewis DFV and Hlavica P (2000): Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochim. et Biophysica Acta*, 1460: 353-374.

Liu ZQ, Cheng ZN, Huang SL, Chen XP, Ou-Yang DS, Jiang CH, Zhou HH (2001): Effect of the CYP2C19 oxidation polymorphism on fluoxetine metabolism in Chinese healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 52:96–99.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

Mamiya K, Hadama A, Yukawa E, Ieiri I, Otsubo K, Ninomiya H, Tashiro N, Higuchi S, (2000): CYP2C19 polymorphism effect on phenobarbitone. Pharmacokinetics in Japanese patients with epilepsy: analysis by population pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol*, 55:821–825.

Margolis JM, O'Donnell JP, Mankowski DC, Ekins S, Obach RS (2000): (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 28:1187–1191.

Matsushita N, Sogava K, Ema M, Yoshida A, Fujii-Kuriyama V (1993): A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consist of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J Biol. Chem.*, 268: 21002-21006.

Maurel P (1996): The CYP3 family. In: Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects. (szerk. Ioannides C) *CRC Press, Boca Raton*, pp 241-270.

Mautz DS, Nelson WL, Shen DD (1995): Regioselective and stereoselective oxidation of metoprolol and bufuralol catalyzed by microsomes containing cDNA-expressed human P4502D6. *Drug Metab Dispos*, 23:513–517.

Margolis JM, O'Donnell, JP, Mankowski DC, Ekins S, Obach RS (2000): (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 28:1187–1191.

Mehvar R, Brocks DR, Vakily M (2002): Impact of stereoselectivity on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiarrhythmic drugs. *Clin Pharmacokinet*, 41: 533-58.

Mellstrom B von Bahr C (1981): Demethylation and hydroxylation of amitriptyline, nortriptyline, and 10-hydroxyamitriptyline in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 9:565–568.

Miners JO and Birkett DJ (1996): Use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic cytochrome P450 2C9. *Methods Enzymol.*, 272: 139-145.

Miners JO, Birkett DJ (1998): Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 45:525–538.

Monostory K, Pascussi J-M (2008): Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chimica Slovenica*, 55: 20-37 (összefoglaló cikk).

Muller M (2000): Transcriptional control of hepatocanalicular transporter gene expression. *Semin. Liver Dis.*, 20: 323-337.

Nebert DW and Russell DW (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360:1155-1162.

Nebert DW and Gonzalez FJ (1987): P450 genes: structure, evolution and regulation., *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.

Nelson DR (1998): Metazoan cytochrome P450 evolution., *Comp. Biochemistry and Physiology*, 121C: 15-22.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession, numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.

Nielsen KK, Flinois JP, Beaune P, Brosten K (1996): The biotransformation of clomipramine *in vitro*, identification of the cytochrome P450s responsible for the separate metabolic pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 277:1659–1664.

Niwa T, Shiraga T, Mitani Y, Terakawa M, Tokuma Y, Kagayama A (2000): Stereoselective metabolism of cibenzoline, an antiarrhythmic drug, by human and rat liver microsomes: possible involvement of CYP2D and CYP3A. *Drug Metab Dispos*, 28:1128–1134.

Niwa T, Shiraga T, Yamasaki S, Ishibashi K, Ohno Y, Kagayama A (2003): In vitro activation of 7-benzoyloxyresorufin O-debenzylation and nifedipine oxidation in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 33: 717-729.

Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Roots I, Brockmüller J (2002): Rapid quantification of CYP3A4 expression in human leukocytes by Real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*, 48: 366-370.

Okita RT and Masters BSS (1992): Biotransformations: the cytochromes P450. *Textbook of Biochemistry*, Devlin T. M. ed. Wiley-Liss, New York, pp 981-999.

Oldham HG and Clarke SE (1997). In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. *Drug Metab Dispos*, 25(8):970-7.

Olesen OV and Linnet K (1999): Studies on the stereoselective metabolism of citalopram by human liver microsomes and cDNA-expressed cytochrome P450 enzymes. *Pharmacology*, dec 59(6):298-309.

Olesen OV and Linnet K (2000): Identification of the human cytochrome P450 isoforms mediating *in vitro* N-dealkylation of perphenazine. *Br J Clin Pharmacol*, 50:563–571.

Ortiz de Montellano PR (1995): Cytochrome P450, 2nd edition, *Plenum, New York*.

Otton SV, Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF (1988): Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 247:242–247.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ (2000): Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol*, 58(6):1441-50.

Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ (2001): Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem*, 268 (24): 6346-58.

Patki KC, von Moltke LL, Greenblatt DJ (2003): In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab Dispos*, 31: 938-944.

Perloff MD, von Moltke LL, Court MH, Kotegawa T, Shader RI, Greenblatt DJ (2000). Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 292:618–628.

Pinot F, Benveniste I, Salaun J-P, Loreau O, Noel J-P, Schreiber L, Durst F (1999): Production in vitro by the cytochrome P450 CYP94A1 of major cutin monomers and potential messengers in plant-pathogen interactions: enantioselectivity studies. *Biochemical Journal*, 342: 27-32.

Porter TD and Coon MJ (1991): Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. of Biological Chem.*, 266: 13469-13472.

Rao N (2007): The clinical pharmacokinetics of escitalopram. *Clin Pharmacokinet*, 46:281–290.

Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR (1994): Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*, 4:39–42.

Rettie AE and Jones JP (2005): Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:477–494.

Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O (1992): Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding from the Ah receptor. *Science*, 256: 1193-1195.

Richardson TH, Johnson EF. (1996): The CYP2C subfamily. In: Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects (Ioannides Ced.). *CRC Press, Boca Raton*, pp 161-181.

Rodriguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gomez-Lechon MJ, Castell JV (2001): Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys*, 393: 308-315.

Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004): Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 427:537–541.

Rydberg T, Jonsson A, Roder M, Melander A (1994): Hypoglycemic activity of glyburide (glibenclamide) metabolites in humans. *Diabetes Care*, 17:1026–1030.

Schenkman JB and Griem H. (1993): Cytochrome P450, *Springer-Verlag, Berlin*.

Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E (2004): Allele and genotype frequencies of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP2D6* in an Italian population. *Pharmacological Research*, 50: 195–200.

Scordo MG, Spina E, Dahl ML, Gatti G, Perucca E (2005): Influence of *CYP2C9*, *2C19*, and *2D6* genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 97:296–301.

Sekino K, Kubota T, Okada Y, Yamada Y, Yamamoto K, Horiuchi R, Kimura K, Iga T, (2003): Effect of the single *CYP2C9**3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, 59:589–592.

Seo T, Nagata R, Ishitsu T, Murata T, Takaishi C, Hori M, Nakagawa K (2008): Impact of *CYP2C19* polymorphisms on the efficacy of clobazam therapy. *Pharmacogenomics*, 9:527–537.

Sharma S (2007): Antiarrhythmic drugs: present and future. *J Assoc Physicians India*, 55: 43–46.

Shu Y, Cheng Z-N, Liu Z-Q, Wang L-S, Zhu B, Huang S-L, Ou-Yang D-S, Zhou H-H (2001): Interindividual variations in levels and activities of cytochrome P-450 in liver microsomes of Chinese subjects. *Acta Pharmacol Sin*, 22: 283-288.

Sindrup SH, Brosen K, Hansen MG, Aaes-Jorgensen T, Overo KF, Gram LF (1993): Pharmacokinetics of citalopram in relation to the sparteine and the mephenytoin oxidation polymorphisms. *Ther Drug Monit*, 15:11–17.

Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR (1998): Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica*, 28: 1129-1165.

Srivastava PK, Yun C-H, Beaune PH, Ged C, Guengerich FP (1991): Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol. Pharmacol.*, 40: 69-79.

Stieger B and Meier PJ (1998): Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 462-467.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA., Zhang ZY, KaminskyLS, ShenfieldGM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA (1996): The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 6:341–349.

Sumida A, Kinoshita K, Fukuda T, Matsuda H, Yamamoto I, Inaba T, and Azuma J (1999): Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 262: 499-503.

Suzuki H and Sugiyama Y (2000): Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver. *Semin. Liver Dis.*, 20: 251-263.

Swainston Harrison T, Perry CM (2004): Aripiprazole: a review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Drugs*, 64:1715–1736.

Tamási V and Monostory K: Citokróm P450 gének és azok variabilitása. A CYP1-4 enzimcsalád. Fejezetek a genomléptékö biológiából és orvostudományból (szerk. Falus A) Semmelweis Kiadó, Budapest, p. 42-58, 2006.

Tamási V, Vereczkey L, Falus A, Monostory K (2003): Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics: *Inflammation research*: 52: 322–333 (összefoglaló cikk).

Thompson EE, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, Yang L, Roe BA, Rienzo A Di (2004): *CYP3A* Variation and the Evolution of Salt-Sensitivity Variants. *Am. J. Hum. Genet*, 75:1059–1069.

Thörn M, Lundgren S, Herlenius G, Ericzon BG, Lööf L, Rane A (2004): Gene expression of cytochromes P450 in liver transplants over time. *Eur J Clin Pharmacol*, 60: 413-420.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD (1993): Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45:205–251.

Tracy TS, Hutzler JM, Haining RL, Rettie AE, Hummel MA, Dickmann LJ (2002): Polymorphic variants (*CYP2C9**3 and *CYP2C9**5) and the F114L active site mutation of *CYP2C9*: effect on atypical kinetic metabolism profiles. *Drug Metab Dispos.*, 30: 385-390.

Transon C, Lecoeur S, Leemann T, Beaunne P, Dayer P (1996): Interindividual variability in catalytic activity and immunoreactivity of three major human liver cytochrome P450 isozymes. *Eur J Clin Pharmacol*, 51: 79-85.

Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G (2008): Metabolism of atypical antipsychotics: involvement of cytochrome p450 enzymes and relevance for drug-drug interactions. *Curr Drug Metab*, 9:410–418.

van der Hoeven TA and Coon MJ (1974): Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 6302-6310.

Vormfelde SV, Engelhardt S, Zirk A, Meineke I, Tuchen F, Kirchheiner J, Brockmoller J (2004): CYP2C9 polymorphisms and the interindividual variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the loop diuretic drug torsemide. *Clin Pharmacol Ther*, 76:557–566.

Wang JH, Liu ZQ, Wang W, Chen XP, Shu Y, He N, Zhou HH (2001): Pharmacokinetics of sertraline in relation to genetic polymorphism of CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther*, 70:42–47.

Wuttke H, Rau T, Heide R, Bergmann K, Bohm M, Weil J, Werner D, Eschenhagen T, (2002): Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther*, 72:429–437.

Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, Ozawa N, Kawai T, Suzuki Y, Goldstein JA, Guengerich FP, Shimada T (1998): Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 56:243–251.

Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjoqvist F, Eliasson E, Dahl ML (2002): Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther*, 71:89–98.

Yasui-Furukori N, Hidestrand M, Spina E, Facciola G, Scordo MG, Tybring G (2001): Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 29:1263–1268.

Yasumori T, Murayama N, Yamazoe Y, Kato R (1990): Polymorphism in hydroxylation of mephentoin and hexobarbital stereoisomers in relation to hepatic P-450 human-2. *Clin Pharmacol Ther*, 47:313–322.

Yoshii K, Kobayashi K, Tsumuji M, Tani M, Shimada N, Chiba K, (2000): Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the 7-hydroxylation of chlorpromazine by human liver microsomes. *Life Sci*, 67:175–184.

Yuan R, Madani S, Wei XX, Reynolds K, and Huang SM (2002): Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 30: 1311-1319.

Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, Boyle G, Law Y, Miller S, Lamba J, Burckart GJ (2003): Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant*, 3:477-483.

Zhou SF (2008). Drugs behave as substrates, inhibitors, and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab*, 9:310-322.

Zhou S-F, Liu J-P, and Chowbay B (2009): Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews*, 41(2): 89-295.

Ziegler DM, Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA ed. (1994): Detoxication: oxidation and reduction., *The liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York, NY., pp 415-427.

Köszönetnyilvánítás

- Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Monostory Katalinnak, aki nemcsak szakmailag hanem emberileg is mindig támogatott, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, ötleteivel, tanácsaival segítette előrehaladásomat és megtanított kutatóként gondolkodni.
- Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kóbori Lászlónak és Dr. Monostory Katalinnak, akik a témához az ötletet adták.
- Szeretnék köszönetet mondani Paulik Józsefnek, akinek kiváló szakmai tudása segítségével elsajátíthattam a munkámhoz nélkülözhetetlen metodikákat. Munkámat értékes tanácsaival mindvégig segítette és sokat tanulhattam tőle.
- Köszönetemet fejezem ki Dr. Szabó Pálnak és munkatársainak, akik a HPLC-MS méréseket végezték. Nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre.
- Köszönetemet fejezem ki az MTA Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Laboratórium dolgozóinak, az általuk nyújtott támogatásért és a munkámat segítő, értékes ötleteikért.
- Szeretnék köszönetet mondani az együttműködő kórházaknak, ahonnan a vér és májmintákat kaptuk, név szerint a Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinikának; a Szent László Kórház, Csontvelő Transzplantációs Osztályának; a Semmelweis Egyetem, Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájának; a Heim Pál Gyermekkorház Madarász utcai Kórházának; a Fejér Megyei Szent György Kórháznak (Székesfehérvár); a Semmelweis Egyetem, II. Gyermekklinikának; és a Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézetnek.
- Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinikán Dr. Sárváry Enikőnek és Gaál Ibolyának, akik vizsgálataikkal segítették a munkát.
- Köszönettel tartozom Dr. Pálinkás Gábornak, Dr. Szépvölgyi Jánosnak, Dr. Hajós Györgynek és Dr. Kardos Júliannának, hogy doktori képzésem elvégzését lehetővé tették a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjában.
- Megköszönöm Dr. Vereczkey Lászlónak, hogy a doktori munkámat a Farmakobiokémiai Osztályon végezhettem, munkámat nélkülözhetetlen tanácsaival segítette.
- Dr. Gráf Lászlónak az ELTE TTK, Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program vezetőjének hálásan köszönöm támogatását és segítőkészségét.

- Végül, de nem utolsósorban, köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak támogatásukat, végtelen türelmüket és a nyugodt háttérrel, melyet mindig biztosítottak számomra a munkám végzése és a disszertáció megírása során.

Melléklet

A CYP génhibák kimutatására PCR alapú módszert dolgoztunk ki. Az egyes PCR termékek azonosítására, így a módszer megbízhatóságának igazolására meghatároztuk az amplikonok nukleotid szekvenciáját. A szekvenálást a Biomi kft (Gödöllő) és Macrogen Europe, Amsterdam, Hollandia végezte.

1. CYP2C9*2 (cDNS-en a 430 C>T báziscsere, 3.exonon) genotípusok forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

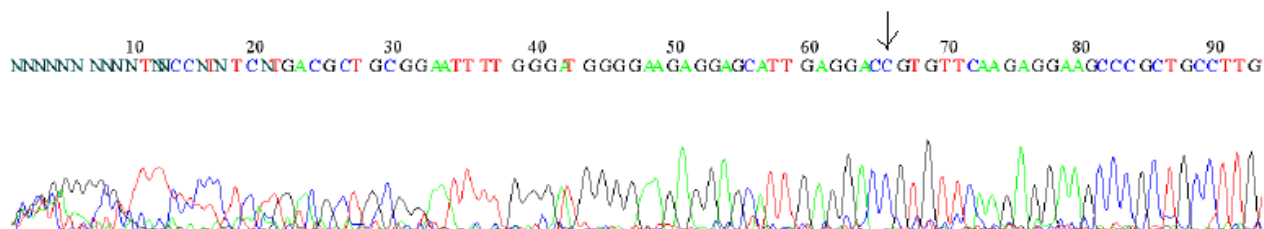
Amplikon (forward irányban):

```
AGCAATGGAAAGAAATGGAAGGAGATCCGGCGTTTCTCCCTCATGAC
GCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC
C/T
GTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAACC
AAG GGTGGGTGACCCTACTCCATATCACTGACCTTA
```

Amplikon (reverz irányban):

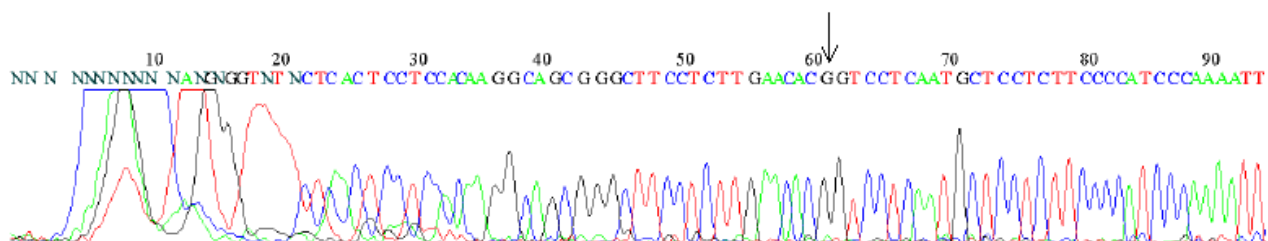
```
TAAGGTCAGTGATATGGAGTAGGGTCACCCACCCTTGGTTTTTCTCA
ACTCCTCCACAAGGCAGCGGGCTTCTCTTGAACAC
G/A
GTCCTCAATGCTCCTCTTCCCCATCCCAAATTCGCGAGCGTCATGA
GGGAGAAACGCCGGATCTCCTTCCATTTCTTCCATTGCT
```

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



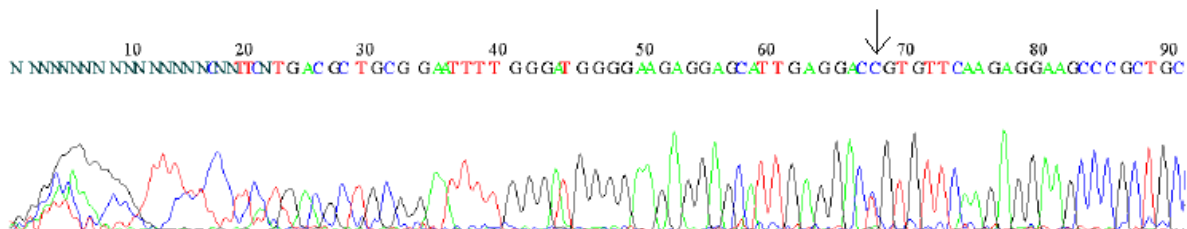
A 66. helyen levő C (kék) alatt nem látható T csúcs (piros), tehát az egyén nem hordoz CYP2C9*2 mutáns allélt.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



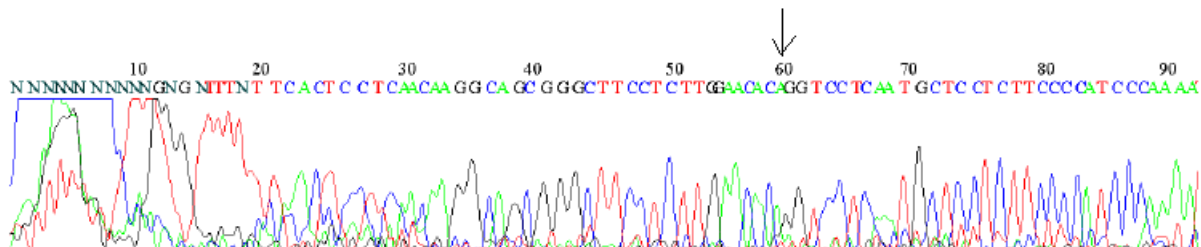
A 61. helyen található G (fekete) alatt nem látható A csúcs (zöld), tehát az egyén nem hordoz CYP2C9*2 mutáns allélt.

Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



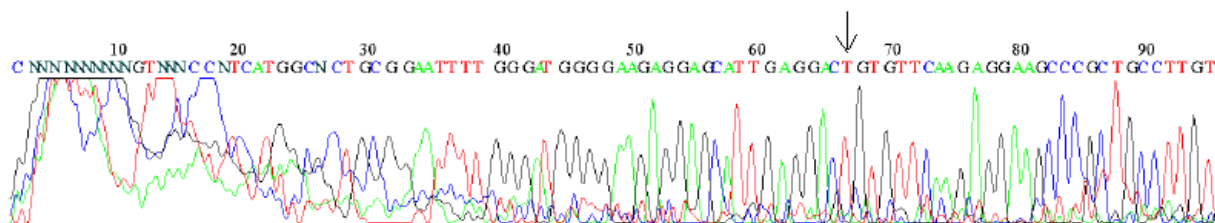
A 68. helyen levő C (kék) alatt megjelenik a T csúcs (piros), tehát az egyén CYP2C9*1 vad, illetve CYP2C9*2 mutáns allélt egyaránt hordoz.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



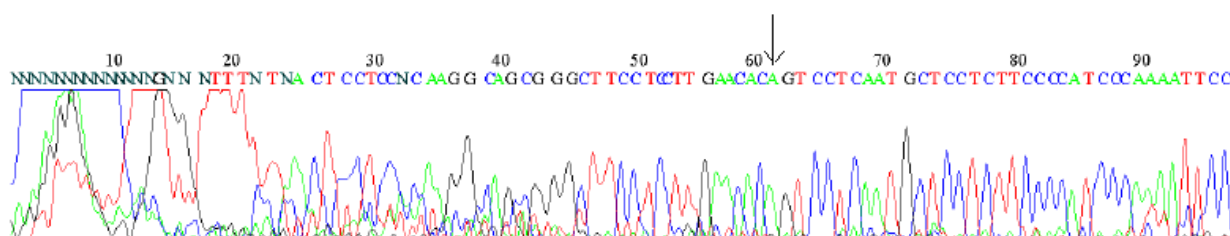
A 60-61. helyen egymás mellett láthatóak mind az A (zöld) mind a G (fekete) csúcsok, tehát az egyén CYP2C9*1 vad, illetve CYP2C9*2 mutáns allélt egyaránt hordoz.

Homozigóta mutáns genotípus forward irányú szekvenálási képe



A 67. helyen látható T (piros) alatt nem jelenik meg a C csúcs (kék), tehát az egyén csak CYP2C9*2 mutáns allélt hordoz.

Homozigóta mutáns genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A 62. helyen látható A (zöld) alatt nem jelenik meg a G csúcs (fekete), tehát az egyén csak CYP2C9*2 mutáns allélt hordoz.

2. CYP2C9*3 (cDNS-en az 1075 A>C báziscsere, 7.exonon) genotípusok forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

Amplikon (forward irányban):

GCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGGTGCACGAGG
TCCAGAGATAC

A/C

TTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCATGCAGTGACCTGTGACATTA
AATTCAGAACTATCTCATTCCCAAGGTAAGT TTGTTTCTCCT

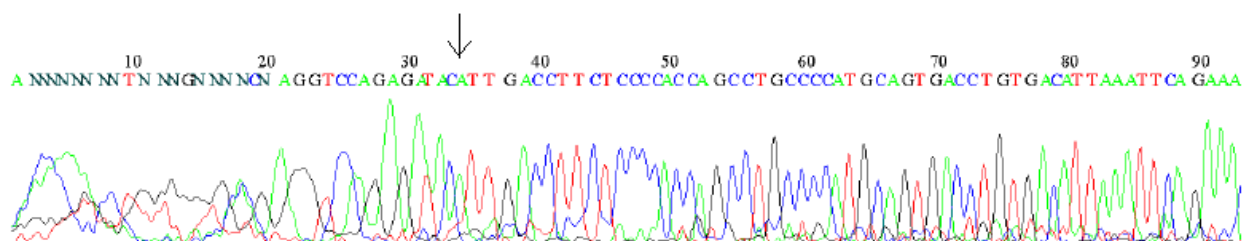
Amplikon (reverz irányban):

AGGAGAAACAACTTACCTTGGGAATGAGATAGTTTCTGAATTTAAT
GTCACAGGTCACATGGGGCAGGCTGGTGGGAGAAGGTCAA

T/G

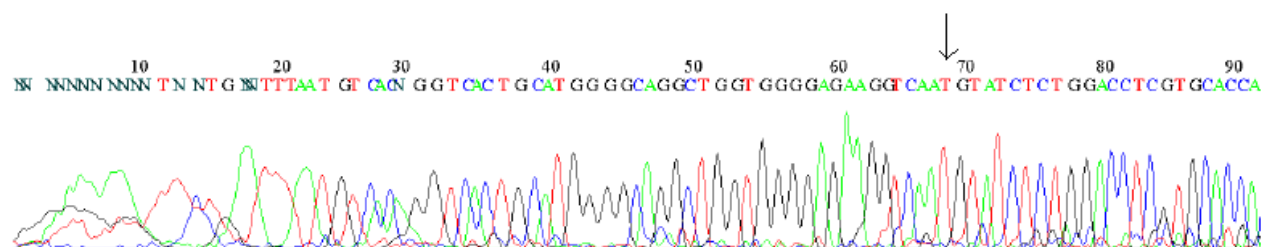
GTATCTCTGGACCTCGTGCACCACAGCATCTGTGTAGGGCATGTGGC
TCCTGTCTTGC

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



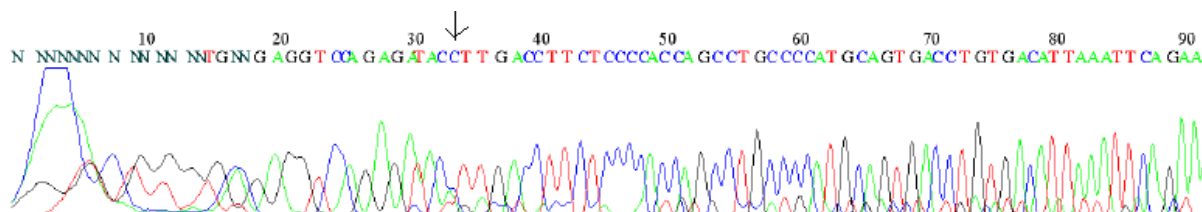
A 35. helyen levő A (zöld) alatt nem látható C csúcs (kék), tehát az egyén nem hordoz CYP2C9*3 mutáns allélt.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



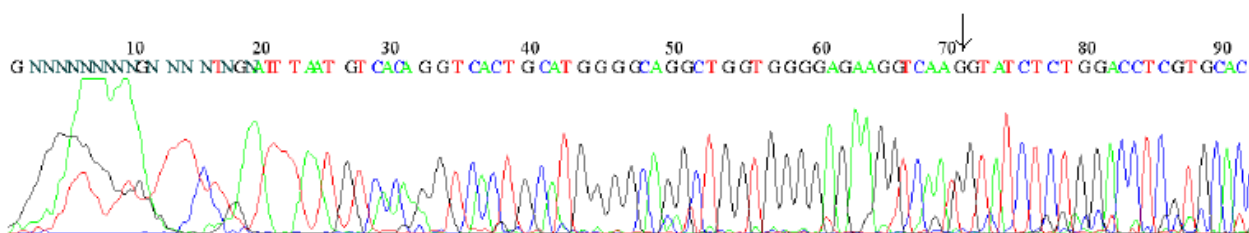
A 69. helyen lévő T csúcs (piros) látható csak, tehát nincs mutáció egyik allélon sem.

Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



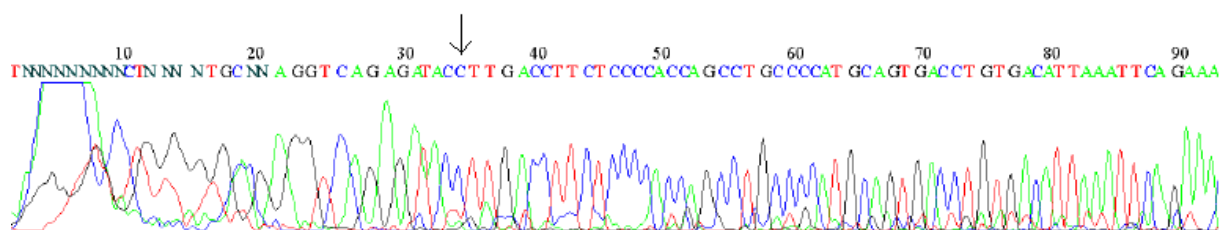
A 33. helyen levő C (kék) alatt látható egy A (zöld) csúcs is, tehát az egyén CYP2C9*1 vad, illetve CYP2C9*3 mutáns allélt egyaránt hordoz.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



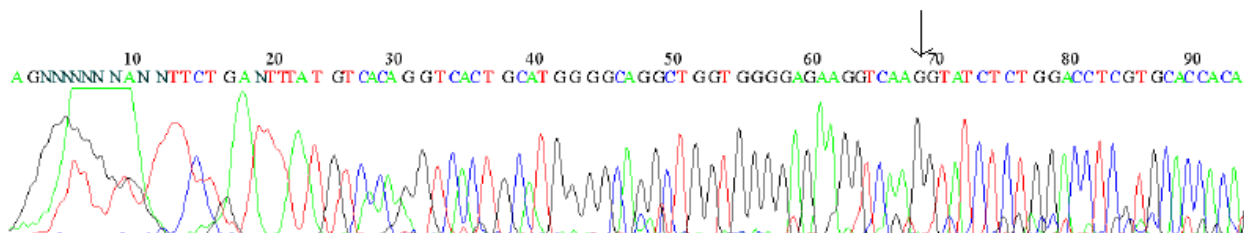
Látható, hogy a 71. helyen lévő G (fekete) alatt van egy T (piros) csúcs is.

Homozigóta mutáns genotípus forward irányú szekvenálási képe



Látható, hogy a 35. helyen lévő C csúcs (kék) van csak jelen, tehát az egyén csak CYP2C9*3 mutáns allélt hordoz.

Homozigóta mutáns genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A 69. helyen lévő G csúcs (fekete) látható csak, tehát mind a két allélon jelen van a mutáció.

3. CYP2C19*2 (cDNS-en a 681 G>A báziscsere, 5. exonon) genotípusok forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

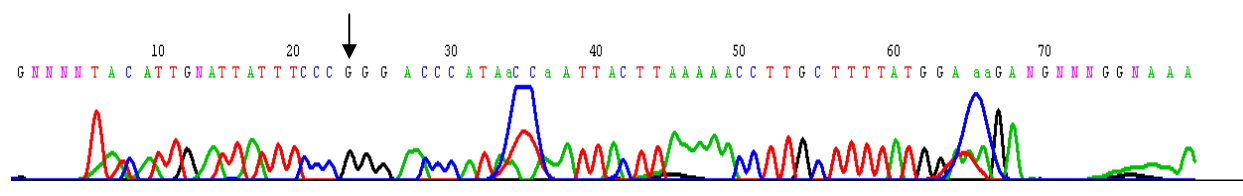
Amplikon (forward irányban):

```
CTTAGATATGCAATAATTTTCCCACCTATCATTGATTATTTCCC  
G/A  
GGAACCCATAACAAATTA CTTAAAAACCTTGCTTTTATGGAA  
AGTGATATTTTGGAGAAAGTAAAAGAACACCAAGAATCGAT  
GGACATCAACAACCCTCGGGACTTTATTGATTGCTTC
```

Amplikon (reverz irányban):

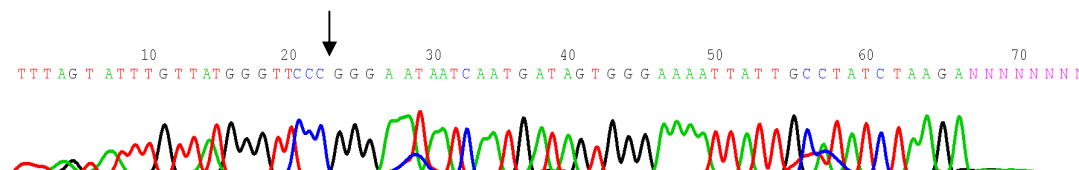
```
GAAGCAATCAATAAAGTCCCGAGGGTTGTTGATGTCCATCGAT  
TCTTGGTGTCTTTTACTTTCTCCAAAATATCACTTCCATAAA  
AGCAAGGTTTTTAAGTAATTTGTTGGGTTCC  
C/T  
GGGAAATAATCAATGATAGTGGGAAAATTATTGCATATCTAAG
```

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



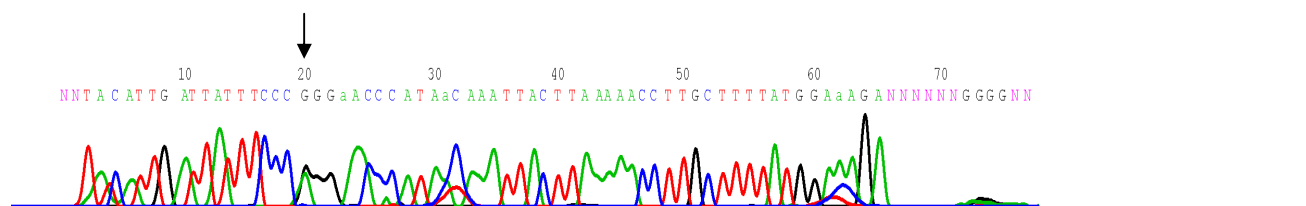
A 24. helyen levő G (fekete) alatt nem látható A csúcs (zöld), tehát az egyén nem hordoz CYP2C19*2 mutáns allélt.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



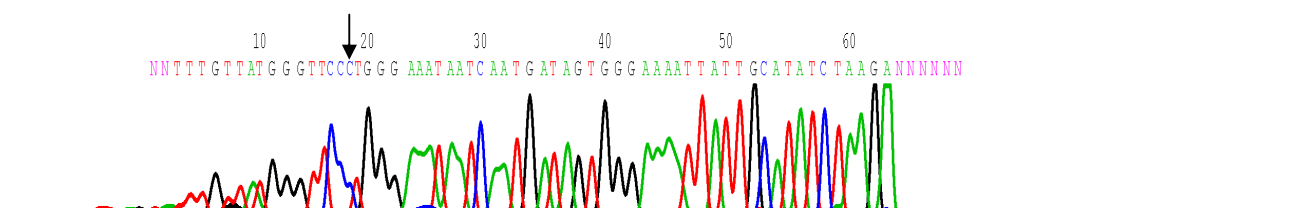
A 23. helyen levő C (kék) alatt nem látható T csúcs (piros), tehát az egyén nem hordoz CYP2C19*2 mutáns allélt.

Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



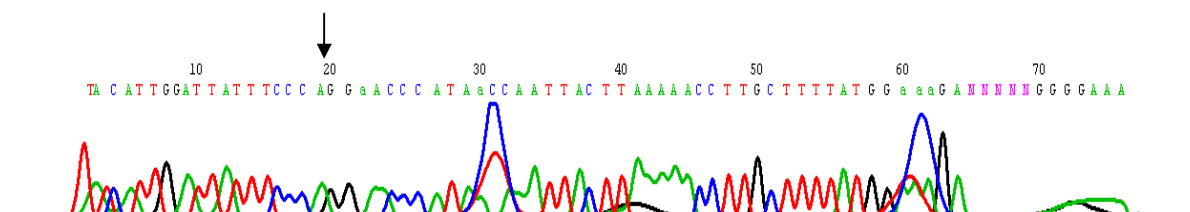
Látható, hogy a 20. helyen lévő G (fekete) alatt van egy A (zöld) csúcs is.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



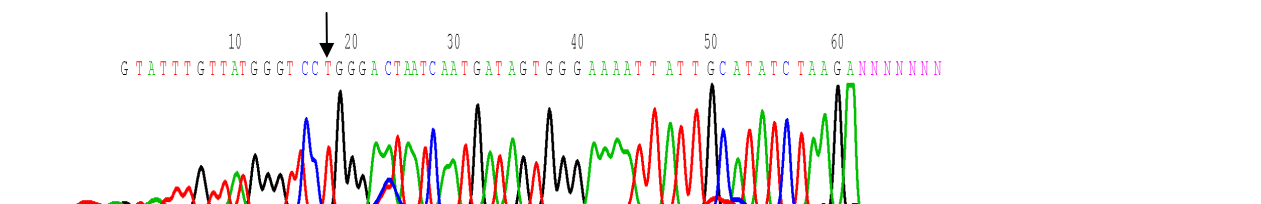
Látható, hogy a 18-19. helyen egymás mellett van a C (kék), illetve a T (piros) csúcs, az egyénben tehát jelen van mind a vad, mind a mutáns allél.

Homozigóta mutáns genotípus forward irányú szekvenálási képe



A 19. helyen levő A (zöld) alatt nem látható G csúcs (fekete), tehát az egyén csak CYP2C19*2 mutáns allélt hordoz.

Homozigóta mutáns genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A 18. helyen levő T (piros) alatt nem látható C csúcs (kék), tehát az egyén csak CYP2C19*2 mutáns allélt hordoz.

4. CYP2C19*3 (cDNS-en a 636 G>A báziscsere, 4. exonon) genotípusok forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

Amplikon (forward irányban):

AGATCAGCAATTTCTTAACTTGATGGAAAAATTGAATGAAAACAT
CAGGATTGTAAGCACCCCCTG

G/A

ATCCAGGTAAGGCCAAGTTTTTTGCTTCCTGAGAAACCACTTACA
GTCTTTTTTTCTGGGAAATCCAAAATTCTATATTGACCAAGCCCTG
AAGTACA

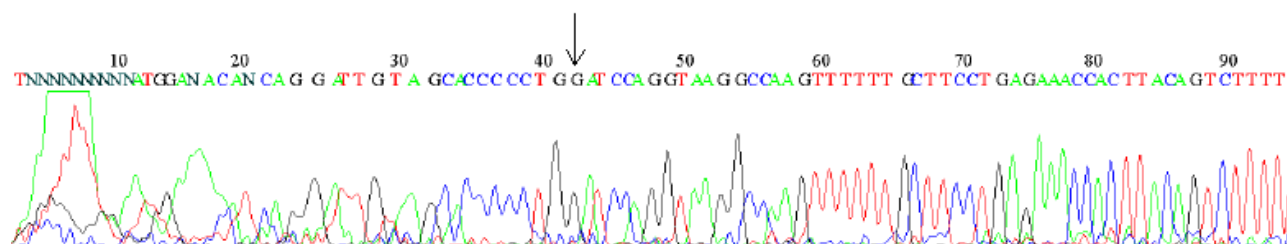
Amplikon (reverz irányban):

TGTA CTT CAGGGCTTGGTCAATATAGAATTTTGGATTTCCAGAAA
AAAAGACTGTAAGTGGTTTCTCAGGAAGCAAAAACTTGGCCTTA
CCTGGAT

C/T

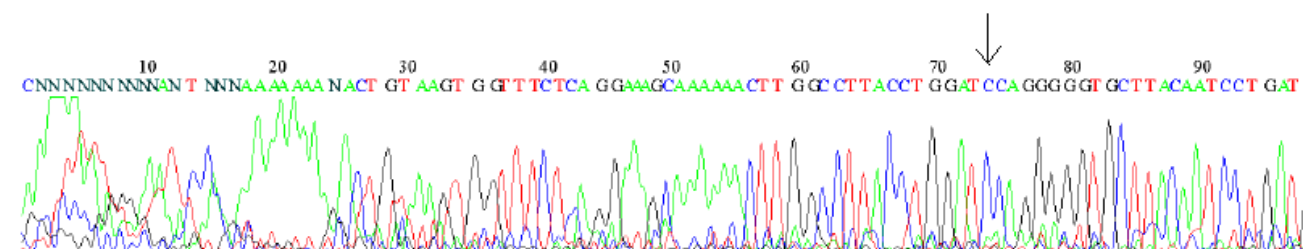
CAGGGGGTGCTTACAATCCTGATGTTTTCAATTTTTCCATCA
AGTTAAGAAATTGCTGATCT

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



A 42. helyen levő G (fekete) alatt nem látható A csúcs (zöld), tehát az egyén nem hordoz CYP2C19*3 mutáns allélt.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A 74. helyen csak C csúcs (kék) látható, tehát az egyén nem hordoz CYP2C19*3 mutáns allélt.

5. CYP2D6*3 genotípusok (DNS-en a 2549. helyen A deléció, 5. exonon) reverz irányú szekvenálási képei

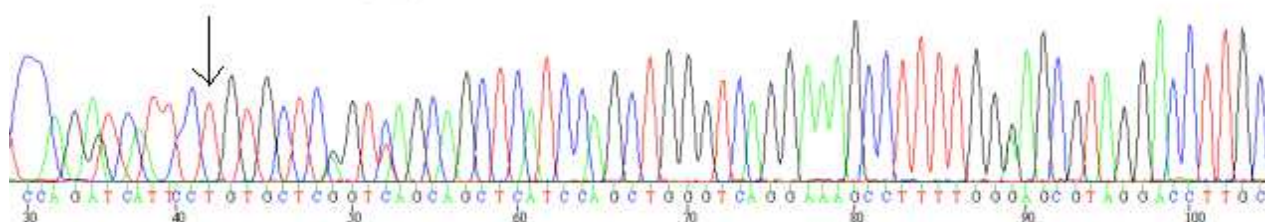
Amplikon forward irányban:

```
TGGCAAGGTCCTACGCTTCCAAAAGGCTTTCCTGACCCAGCTGGATGA  
GCTGCTAACTGAGCAC(A)GGATGACCTGGGACCCAGCCCAGCCCCC  
CGAGACCTGACTGAGGCCTTCTGGCAGAGATGGA
```

Amplikon reverz irányban:

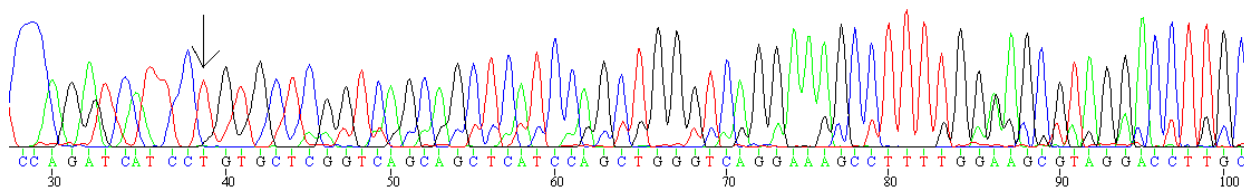
```
TCCATCTCTGCCAGGAAGGCCTCAGTCAGGTCTCGGGGGGGCTGGGCT  
GGGTCCCAGGTCATCC(T)GTGCT CAGTTAGCAG CTCATCCAGCTGGGT  
CAGGAAAGCCTTTTGGAAAGCGTAGGACCTTGCCA
```

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A T deléció a 42. helyen található. Tiszta szekvencia olvasható ki a 42. hely után is, ami homozigóta vad genotípusra utal.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



A heterozigótánál látható, hogy a T deléciótól (39. hely, lásd a nyilat) jobbra minden bázis csúcsának balra válla van, ami a kevert (vad/mutáns) amplikon szekvenciára utal. A homozigóta vad genotípus esetében a csúcsoknak nincsen válla, a reakció során csak vad típusú termék keletkezett. Homozigóta mutáns genotípusú egyént idáig még nem találtunk.

6. CYP2D6*4 genotípusok (DNS-en az 1846 G>A báziscsere, 3. intronon) forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

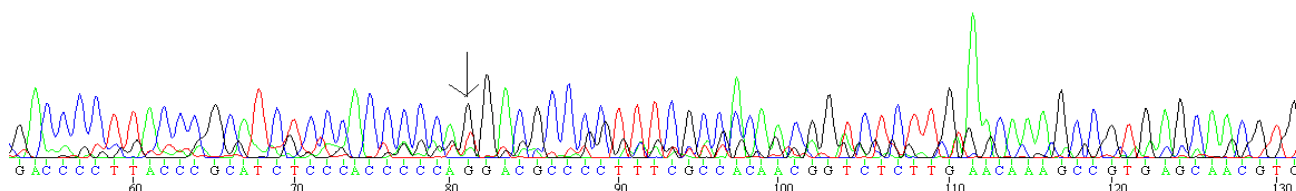
Amplikon forward irányban:

```
CTTCGCCAACCCTCCGGTGGGTGATGGGCAGAAGGGCACAAGCGGGA  
GGGAAGGCGGGGGACGGGAAGGCGACCCCTTACCCGCATCTCCCACCCCA  
G/A  
GACCCCCCTTTCGCCCCAACGGTCTCTTGGACAAAGCCGTGAGCAACGTGATC  
GCCTCCCTCACCTGCGGGCGCCGCTTCGAGTACGACGACCCTCGTTCCCTCAG  
GCTGCTGGACCTAGCTCAGGAGGGACTGAAGGAGGAGTCGGGCTTTCT
```

Amplikon reverz irányban:

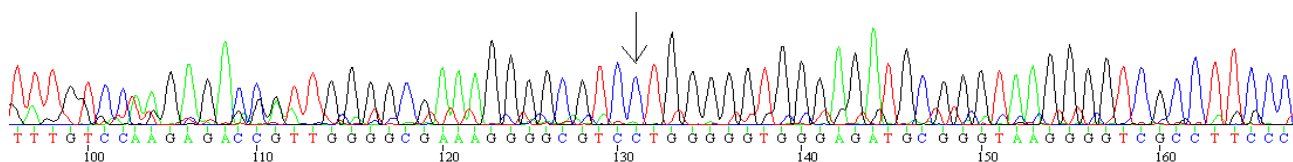
```
AGAAAGCCCGACTCCTCCTTCAGTCCCTCCTGAGCTAGGTCCAGCAGCCTGAG  
GAAGCGAGGGTCGTCTGACTCGAAGCGGCGCCCGCAGGTGAGGGAGGCGATC  
ACGTTGCTCACGGCTTTGTCCAAGAGACCGTTGGGGCGAAAGGGGCGTC  
C/T  
TGGGGGTGGGAGATGCGGGTAAGGGGTGCGCTTCCCCGTCCCCCGCCTTCCCA  
GTTCCCGCTTTGTGCCCTTCTGCCATCACCCACCGGAGTGGTTGGCGAAG
```

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



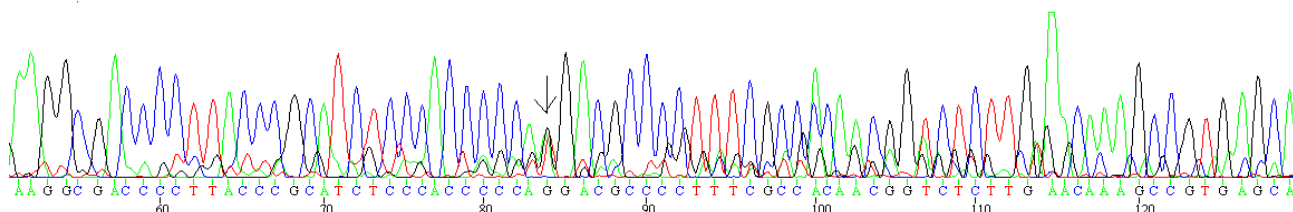
Látható, hogy a 81. helyen a G (fekete) alatt nem található A csúcs. Az egyén tehát homozigóta vad genotípusú.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



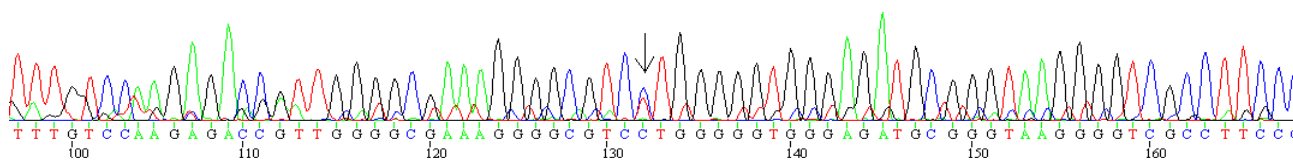
Szépen látszik, hogy a 131. a C (kék) csúcs alatt nem található T (piros) csúcs. Az egyén egyik allélján sincs CYP2D6*4 mutáns allél.

Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



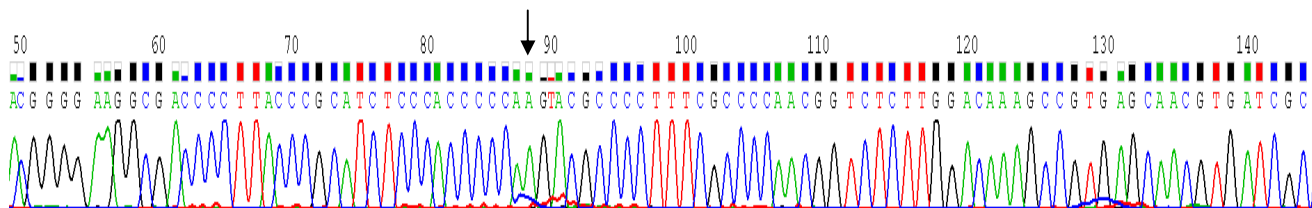
A reakció során keletkezhetett melléktermék, ezért nehezen látható, de 84. G (fekete) alatt van egy A (zöld) csúcs, az egyén tehát heterozigóta genotípusú. A reverz irányú szekvenálási képen jobban látható heterozigóta genotípust kaptunk.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



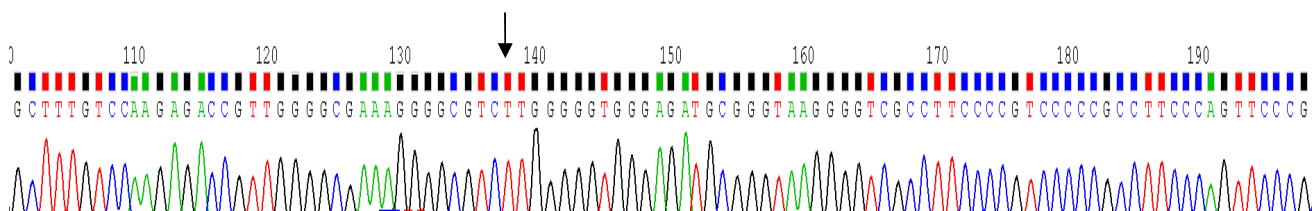
Szépen látszik, hogy a 132. C (kék) alatt található egy T (piros) csúcs. Az egyén tehát heterozigóta genotípusú.

Homozigóta mutáns genotípus forward irányú szekvenálási képe



Látható, hogy a 88. helyen levő A (zöld) alatt nincs jelen a G (fekete) csúcs. Az egyénnek mindkét allélján jelen van a CYP2D6*4 mutáció.

Homozigóta mutáns genotípus reverz irányú szekvenálási képe



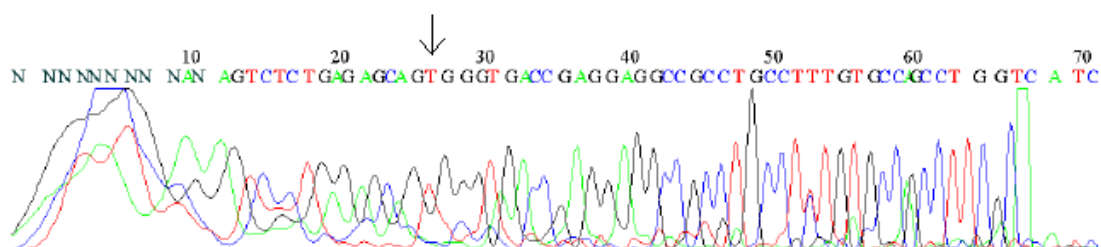
Szépen látszik, hogy a 138. helyen levő T (piros) alatt nincs jelen a C (kék) csúcs. Az egyénnek mindkét allélján jelen van a CYP2D6*4 mutáció.

7. CYP2D6*6 genotípusok (DNS-en 1795. helyen T deléció, 3. exonon) forward irányú szekvenálási képei

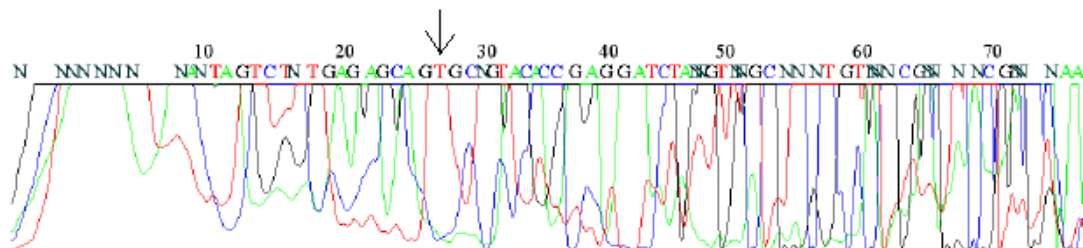
Amplikon forward irányban:

TCTCCGTGTCCACCTTGCGCAACTTGGGCCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAGCAG
(T)
GGGTGACCGAGGAGGCCGCCTTGTGCCGCCTTCGC

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



Látható, hogy a homozigóta vad genotípusnál a 27. helyen levő T csúcs (piros) után egy tiszta szekvenciát kapunk. A heterozigóta genotípusú egyén esetében a nyíllal megjelölt T csúcstól jobbra olvashatatlan, kevert szekvencia látható.

A reverz irányú szekvenálásnál nem kaptunk jól látható eredményt.

8. CYP3A5*3 genotípusok (DNS-en az 6986 A>G báziscsere, 3. intronon) forward, illetve reverz irányú szekvenálási képei

Amplikon forward irányban:

TTCACTGACCTAATATTCTTTTTGATAATGAAGTATTTTAAACATATAAA
ACATTATGGAGAGTGGCATAGGAGATACCCACGTATGTACCACCCAGCT
TAACGAATGCTCTACTGTCATTTCTAACCATAATCTCTTTAAAGAGCTCT
TTTGTCTTTCA

A/G

TATCTCTTCCCTGTTTGGACCACATTACCCTTCATCATATGAAGCCTTGG
GTGGCTCCTGTGTGAGACTCTTGCTGTGTGTCACACCCTAATGAAGTAG
AACCTAAGGTTGCTGTGTGTCGTAACAAGTAGGGGTATGGAT

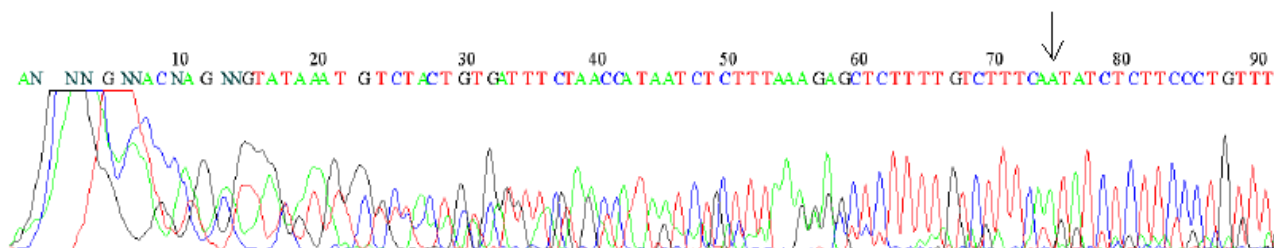
Amplikon reverz irányban:

ATCCATACCCCTAGTTGTACGACACACAGCAACCTTAGGTTCTAGTTCATTAGGG
TGTGACACACAGCAAGAGTCTCACACAGGAGCCACCCAAGGCTTCATATGATGA
AGGGTAATGTGGTCCAAACAGGGAAGAGATA

T/C

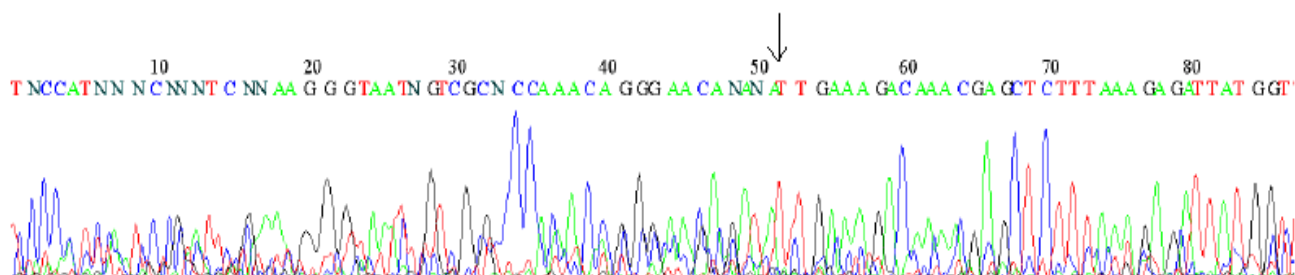
TGAAAGACAAAAGAGCTCTTTAAAGAGATTATGGTTAGAAATGACAGTAGAGCA
TTCGTTAAGCTGGGTGGTACATACGTGGGTATCTCCTATGCCACTCTCCATAATGT
TTTATATGTTTAAAATACTTCATTATCAAAAAGAATATTAGGTCAGTGAA

Homozigóta vad genotípus forward irányú szekvenálási képe



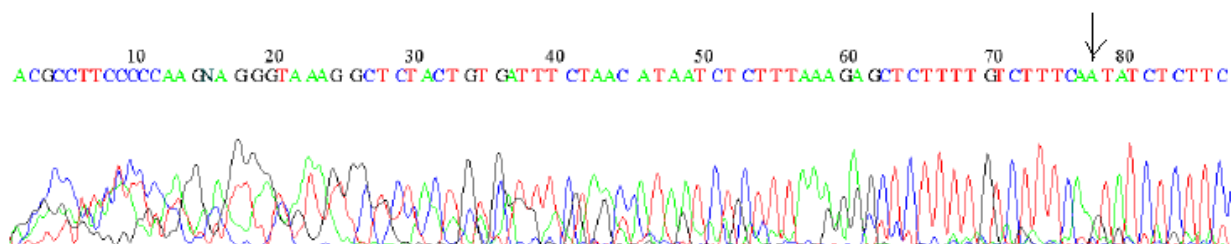
A 75. helyen látható A (zöld) mellett/alatt nem található G csúcs (fekete). Az egyén tehát homozigóta vad genotípusú.

Homozigóta vad genotípus reverz irányú szekvenálási képe



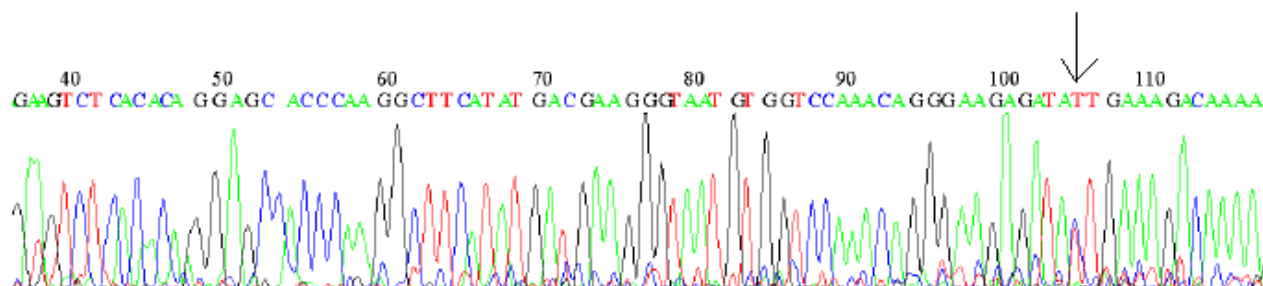
Az 52. helyen látható T (piros) mellett/alatt nem található C csúcs (kék). Az egyén tehát csak CYP3A5*1 allélt hordoz. A forward irányú szekvenálási képen a csúcsok szebben látszanak.

Heterozigóta genotípus forward irányú szekvenálási képe



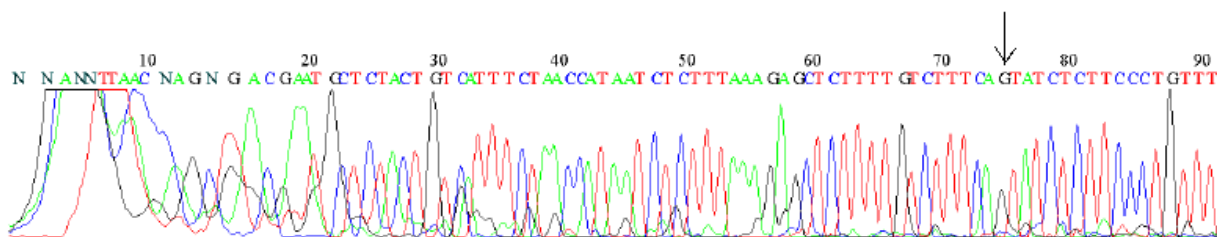
A 77. helyen látható A (zöld) mellett található még egy hasonló intenzitású G csúcs (fekete) is. Az egyénben tehát vad és mutáns típusú allél egyaránt jelen van.

Heterozigóta genotípus reverz irányú szekvenálási képe



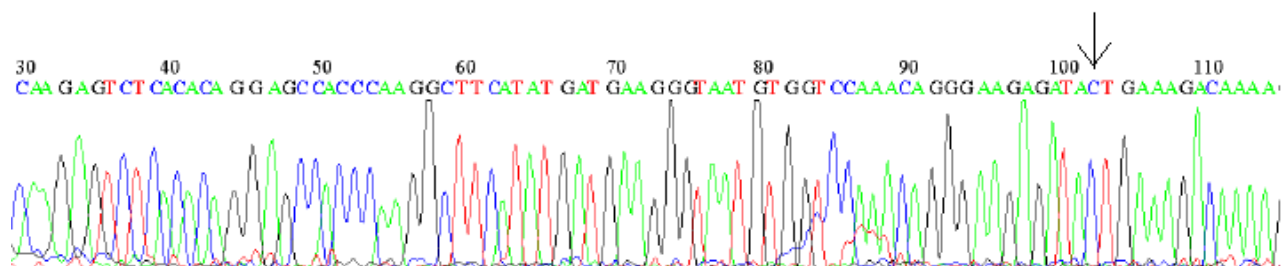
Az 106. helyen látható T (piros) csúcson megtalálható a C (kék) csúcs is. Az egyén tehát heterozigóta genotípusú.

Homozigóta mutáns genotípus forward irányú szekvenálási képe



A 75. helyen látható G csúcs (fekete) mellett/alatt nem található A csúcs (zöld). Az egyén tehát homozigóta mutáns genotípusú.

Homozigóta mutáns genotípus reverz irányú szekvenálási képe



Az 102. helyen látható C (kék) mellett/alatt nem található T csúcs (piros). Az illető tehát csak a CYP3A5*3 mutáns allélt hordozza.