



EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

GENOTÍPUS ALAPJÁN TÖRTÉNŐ CYP2C19 ÉS CYP2D6 FENOTÍPUS BECSLÉS ÉS KLINIKAI ALKALMAZHATÓSÁGA

Doktori értekezés

Kiss Ádám Ferenc
Okleveles biomérnök

Témavezető: Dr. Monostory Katalin Ph.D.
tudományos főmunkatárs

Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport

Biológia Doktori Iskola
Doktori Iskola vezető: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Program
Programvezető: Dr. Kovács Mihály



Készült: MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

Budapest

2019

1	BEVEZETÉS	5
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1	KÁROS GYÓGYSZER-MELLÉKHATÁSOK ÉS GYÓGYSZER-INTERAKCIÓK ELŐFORDULÁSA	6
2.2	GYÓGYSZER-METABOLIZMUS	7
2.3	A CITOKRÓM P450 ENZIMRENDSZER	8
2.4	CYP EXPRESSZIÓT ÉS ENZIMFUNKCIÓT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK	10
2.4.1	<i>CYP2C19</i>	14
2.4.2	<i>CYP2D6</i>	16
2.4.3	<i>CYP3A4/5</i>	20
2.5	PSZICHIÁTRIAI KÓRKÉPEK	22
2.6	A PSZICHIÁTRIAI BETEGSÉGEK GYÓGYSZERES KEZELÉSE	24
2.6.1	<i>Klozapin</i>	25
2.6.2	<i>Aripiprazol</i>	26
3	CÉLKITŰZÉSEK	28
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
4.1	FELHASZNÁLT VEGYSZEREK.....	29
4.2	<i>IN VITRO</i> GENOTÍPUS-ALAPÚ FENOTÍPUS BECSLÉS VIZSGÁLATOK	29
4.2.1	<i>Humán májszövet minták</i>	29
4.2.2	<i>Mikroszóma preparálás menete</i>	29
4.2.3	<i>Specifikus CYP enzimaktivitás meghatározása</i>	31
4.2.4	<i>Genomiális DNS izolálás</i>	32
4.2.5	<i>RNS izolálás</i>	32
4.2.6	<i>Reverz transzkripció</i>	33
4.2.7	<i>Polimeráz láncreakció (PCR)</i>	33
4.2.8	<i>CYP allélvariánsokra jellemző SNP-k kimutatása</i>	33
4.2.9	<i>CYP2D6 allél-specifikus kópiaszámának meghatározása</i>	34
4.2.10	<i>CYP2C19 mRNS szint mérése</i>	35
4.3	KLINIKAI VIZSGÁLATOK	35
4.3.1	<i>Humán vérminták</i>	35
4.3.2	<i>Vérszint mérések</i>	37
4.3.3	<i>Fehérvérsejt izolálás</i>	38
4.3.4	<i>A gyógyszer-metabolizáló képesség becslése</i>	38
4.4	AZ ARIPIPAZOL METABOLIZMUS GÁTLÁSVIZSGÁLATA	39
4.5	STATISZTIKAI ÉRTÉKELÉS	40
5	EREDMÉNYEK	42
5.1	<i>CYP2D6</i> ALLÉL-SPECIFIKUS KÓPIASZÁM MÉRÉSE	42
5.2	CYP <i>IN VITRO</i> ENZIMAKTIVITÁS ÉS A GENOTÍPUS KAPCSOLATA	43
5.2.1	<i>CYP2C19 és CYP2D6 enzimaktivitás egyéni eltérései</i>	43

5.2.2	<i>CYP2C19 és CYP2D6 allélgyakoriságok a májszövet donoroknál</i>	46
5.2.3	<i>Összefüggések a CYP enzimaktivitások és a CYP genotípus között</i>	47
5.2.3.1	<i>Összefüggések a CYP2C19 enzimaktivitás és a CYP2C19 genotípus között</i>	48
5.2.3.2	<i>A CYP2C19 mRNS expresszió és a CYP2C19*17 allélvariáns kapcsolata</i>	50
5.2.3.3	<i>Összefüggések a CYP2D6 enzimaktivitás és a CYP2D6 genotípus között</i>	51
5.3	<i>A CYP FENOTÍPUS BECSLÉS KLINIKAI ALKALMAZHATÓSÁGA</i>	53
5.3.1	<i>CYP2C19 genotípus-alapú fenotípus becslés alkalmazhatósága klozapin terápia során</i>	54
5.3.2	<i>CYP2D6 genotípus-alapú fenotípus becslés alkalmazhatósága aripiprazol terápia során</i>	57
5.3.3	<i>A párhuzamosan alkalmazott gyógyszeres kezelés és az aripiprazol expozíció</i>	64
6	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	66
6.1	<i>A CYP2C19 GENOTÍPUS SZEREPE A FENOTÍPUS KIALAKÍTÁSÁBAN ÉS A KLOZAPIN FARMAKOKINETIKÁJÁBAN</i>	66
6.2	<i>A CYP2D6 GENOTÍPUS SZEREPE A FENOTÍPUS KIALAKÍTÁSÁBAN ÉS AZ ARIPIPRAZOL FARMAKOKINETIKÁJÁBAN</i>	71
7	TÉZISPONTOK	77
8	KIVONAT	78
9	ABSTRACT	79
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
11	IRODALOMJEGYZÉK	81
12	FÜGGELÉK	93

RÖVIDÍTÉSEK

AhR: aromás szénhidrogén receptor

BHQ: black hole quencher

C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

CAR: konstitutív androsztán receptor

CYP: citokróm P450

DEPC: dietil-pirokarbonát

dNTP: dezoxiribonukleozid-trifoszfát

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

EM: extenzív metabolizáló

EPS: extrapiramidális mellékhatás

GABA: γ -amino-vajsav

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GR: glükokortikoid receptor

HNF: hepatikus nukleáris faktor

HPLC: magas nyomású folyadékkromatográf

IM: intermediér metabolizáló

LC-MS/MS: folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

NADPH: α -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

PBS: phosphate buffered saline

PLS: partial least square

PM: gyenge metabolizáló

PXR: pregnán X receptor

RT-PCR: Real-time polimerase chain reaction

RXR: retinoid X receptor

SD: standard deviation

SNP: single nucleotide polymorphism

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

UM: ultra-gyors metabolizáló

VDR: D-vitamin receptor

1 BEVEZETÉS

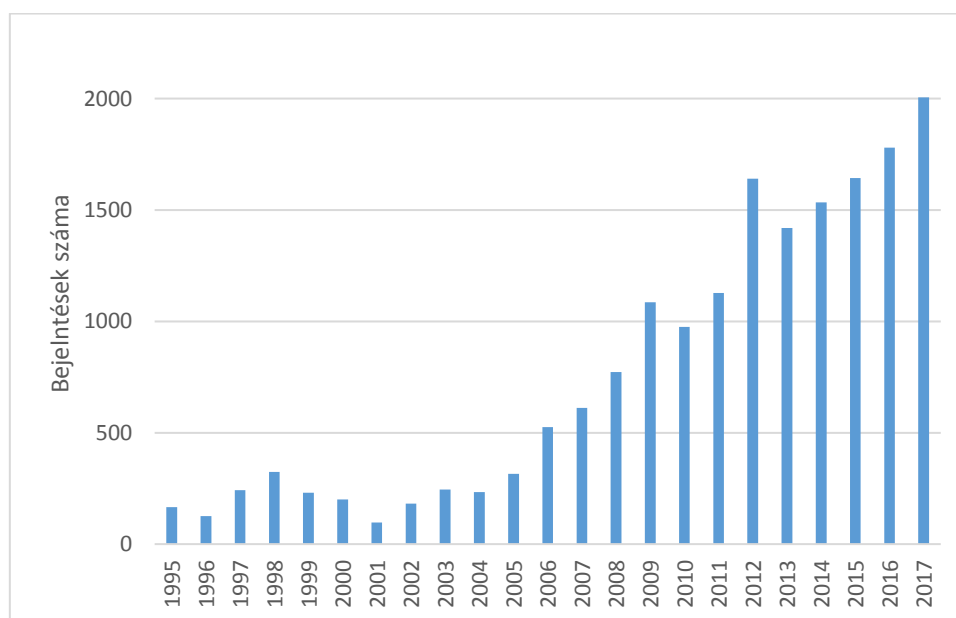
Gyógyszeres terápia során a káros gyógyszer-mellékhatások kialakulásáért és a hatás-elmaradásért jelentős mértékben a betegek eltérő gyógyszer-metabolizáló képessége tehető felelőssé. A gyógyszer-metabolizmus egyéni eltéréseiből fakadó problémák kiküszöböléséhez ismernünk kell a lebontó folyamatokban részt vevő enzimek fenotípusának kialakításában szerepet játszó tényezőket, melyek megismerésével lehetővé válik a betegek személyre szabott gyógyszeres terápiája, ezzel csökkentve a hatás-elmaradás és a káros mellékhatások kialakulásának kockázatát. Farmakogenetikai megközelítéssel az egyéni gyógyszer-metabolizáló képességet genetikai információk alapján becsüljük, majd ezek alapján igyekszünk a beteg optimális gyógyszeres kezelését, dozírozását meghatározni. A genetikai információ felhasználásához azonban ismernünk kell a hatóanyagok farmakokinetikáját befolyásoló enzimek genotípus-fenotípus kapcsolatait, valamint azokat a nem-genetikai vagy külső tényezőket, melyek hatással lehetnek az enzimek kifejeződésére és aktivitására a genetikai tulajdonságokon túlmenően.

A citokróm P450 (CYP) enzimek fontos szerepet játszanak a legtöbb gyógyszervegyület metabolizmusában, ezáltal meghatározó szerepük van a xenobiotikumok farmakokinetikájának kialakításában. Kutatómunkánk során két, nagymértékű genetikai polimorfizmussal rendelkező CYP enzim, a CYP2D6 és a CYP2C19 genotípusa és fenotípusa közötti összefüggéseket vizsgáltuk magyarországi szervdonorok májszövetét felhasználva. A genotípus-alapú fenotípus becslés hatékonyságának javítása érdekében olyan nem-genetikai tényezőket kerestünk, melyeket bevonva az értékelésbe javítható a predikció. Az *in vitro* vizsgálatok tapasztalatait két, pszichiátriai betegeknél alkalmazott antipszichotikum, a klozapin és az aripiprazol farmakokinetikájának vizsgálatához igyekeztünk felhasználni, figyelembe véve a betegek CYP2C19, illetve a CYP2D6 és CYP3A genotípusát, a hatóanyagok és a metabolitok vérszintjét, valamint CYP enzim gátló vegyületek párhuzamos terápiáját. A hatóanyagok vérszintjét meghatározó tényezők jellemzésével reményeink szerint javítható lesz az antipszichotikum terápia hatékonysága, ezzel csökkenthetjük a hatás-elmaradásnak és a káros mellékhatások kialakulásának kockázatát.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Káros gyógyszer-mellékhatások és gyógyszer-interakciók előfordulása

Magyarországon a bejelentett káros gyógyszer-mellékhatások (adverse drug reactions – ADR) száma évről évre dinamikusan emelkedik (1. ábra), mely részben azzal magyarázható, hogy a gyógyszer-fogyasztás emelkedik, másrészt annak köszönhető, hogy az orvos-társadalom, a gyógyszer-engedélyező hatóságok és a gyógyszer-forgalmazó cégek egyre nagyobb figyelmet fordítanak a problémára. A nem-kívánt mellékhatások jelentős közegészségügyi terhet rónak a társadalomra: az Európai Bizottság becslése szerint az ebből fakadó egészségkárosító hatás teljes költsége 79 milliárd euróra tehető, mindemellett a kórházi felvételek 5 százalékát káros gyógyszerreakciók miatt rendelik el, a bennfekvő betegek 5 százaléka szenved a készítmények ártalmas és nem-kívánt hatásaitól, és ez a kórházi halálesetek ötödik leggyakoribb oka [<http://medicalonline.hu/>]. Kimutatások alapján gyógyszer-interakció tehető felelőssé az összes kórházi felvétel 1,1%-ért, mely a gyógyszer mellékhatások miatti felvételek 22%-át teszi ki [Day *et al.* 2017]. A gyógyszerek hatástalansága szintén jelentős probléma. A betegek mindössze 30-60%-a reagál megfelelően az antidepresszáns, béta-blokkoló, sztatin vagy antipszichotikum terápiára [Ingelman-Sundberg *et al.* 2010].



1. ábra. A mellékhatás-bejelentések számának alakulása Magyarországon (OGYÉI adatai alapján, https://www.ogyei.gov.hu/eves_jelentesek)

Az egyéni gyógyszerválasz eltérései sok esetben farmakokinetikai különbségekből fakadnak, melyek főként a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő enzimek (pl. CYP enzimek) aktivitásbeli eltéréseire vezethetők vissza. A gyógyszer-metabolizáló enzimek egyéni különbségei egyrészt öröklötten kódolt, genetikai tulajdonságokból, másrészt a gyógyszer-lebontó enzimek kifejeződését vagy aktivitását befolyásoló nem-genetikai és környezeti hatásokból (életkor, hormonális hatások, táplálkozás, dohányzás, betegség, gyógyszeres kezelés) eredhetnek, mely tényezők felismerése és azonosítása jelenleg is nagy kihívás, és különösen fontos lenne szűk terápiás tartománnyal rendelkező hatóanyagok alkalmazásánál [Zanger és Schwab 2013].

2.2 Gyógyszer-metabolizmus

Az emberi szervezet számára a testidegen anyagok (xenobiotikumok) expozíciója folyamatos és elkerülhetetlen. A xenobiotikumok lehetnek természetes vagy mesterséges anyagok, mint a növényi metabolitok és alkaloidok, égéstermékek, kozmetikumok, háztartási vegyszerek és a gyógyszerek. A vegyületek lipofil jellegüknek köszönhetően felszívódhatnak a bőrön, tüdőn vagy az emésztőrendszeren keresztül, és éppen lipofil fiziko-kémiai tulajdonságuk miatt eliminációjuk lassú folyamat. A gyorsabb kiürülés érdekében a szervezet a testidegen anyagokat enzimes reakciókban alakítja át, melynek eredményeként a vegyület polaritása általában növekszik és vízoldhatóvá válik. Ez utóbbi folyamatokat nevezzük biotranszformációnak. A biotranszformációs folyamatokban megkülönböztetünk Fázis 1 és Fázis 2 reakciókat. Míg Fázis 1 reakciók során oxidáció, hidrolízis és redukció történik és jellemzően monooxigenázok (CYP, flavin-monooxigenáz) katalizálják, addig Fázis 2 folyamatok közé a konjugációs reakciókat soroljuk. Utóbbi esetben a xenobiotikum szubsztrát vagy a Fázis 1 metabolit egy funkciócsoportjára konjugációs enzim segítségével valamilyen endogén, poláris kofaktor (pl. glükuronsav, glutation, aminosavak, szulfát, acetyl) kovalensen kapcsolódik. Mivel az elimináció sebességét az enzimatikusan átalakított vegyületek sejtől való transzportja is befolyásolja, ezért kiterjeszhető a rendszer a Fázis 3 folyamatokkal, mint a transzporterek működésével [Josephy *et al.* 2005]. A xenobiotikumok kiválasztása túlnyomórészt a vizeletbe és az epébe történik, melyben az ATP binding cassette (ABC) családba tartozó transzporterek játszanak fontos szerepet [Döring *et al.* 2014].

Bár a biotranszformációs folyamatok ezen felosztása a mai napig elfogadott és használt, olykor félrevezető lehet, hiszen pl. a konjugációt nem minden esetben előzi meg Fázis 1 reakció, illetve bizonyos vegyületek oxidációját konjugáció előzi meg [Parkinson *et al.* 2013].

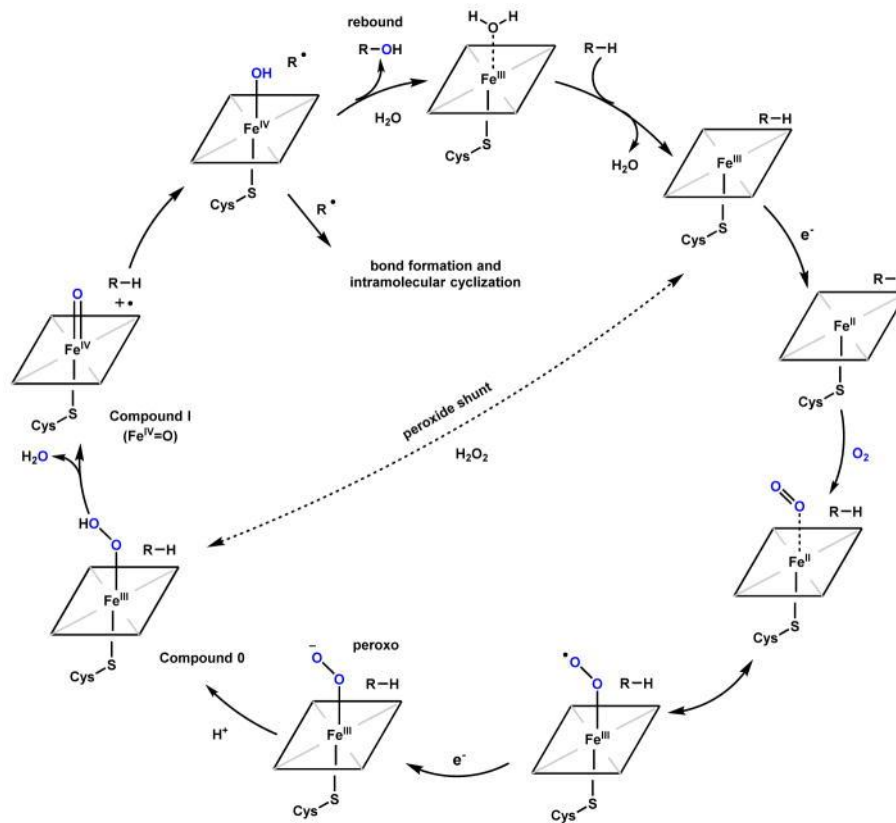
2.3 A citokróm P450 enzimrendszer

A citokróm P450 (CYP) szupercsaládba tartozó enzimek endogén szubsztrátok (pl. epesavak, szteroidok, zsírsavak, neurotranszmitterek) és xenobiotikumok oxidatív, peroxidatív és redukzív átalakítását végzik. Ősi eredetüket bizonyítja, hogy a baktériumok is expresszálnak CYP enzimeket, bár kezdetben szerepük feltehetően csak az endogén szteroid-metabolizmusban és -szintézisben lehetett [Rendic *et al.* 1997]. A P450 elnevezés abból a spektroszkópiai megfigyelésből származik, hogy az enzimek redukált formájának szén-monoxiddal képzett komplexe 450 nm-nél jellemző abszorpciós maximumot mutat. A szupercsaládba tartozó enzimeket aminosav-szekvencia homológia alapján családokra és alcsoportokra osztják: 40%-os hasonlóság esetén egy családba, 55%-os hasonlóság esetén egy alcsoportba sorolhatók az egyes CYP enzimek. A CYP betűjelek után arab számmal jelölik az enzimes családot, betűvel az alcsoportot, majd arab számmal az adott enzimet.

A CYP enzimek az eukariótákban membránkötött fehérjék, intracellulárisan a sima felszínű endoplazmás retikulum és a mitokondrium membránjában helyezkednek el. A szervezetben a xenobiotikumok lebontásában részt vevő CYP enzimek legnagyobb mennyiségben a máj endoplazmás retikulumában (mikroszómában) található, bár kimutathatók más szövetekben is (pl. vékonybél, vese, tüdő, agy, placenta). A máj CYP enzimekészlete nagymértékben meghatározza a gyógyszerhatás hosszát és intenzitását, illetve toxicitását. A biotranszformáció általában csökkenti vagy megszünteti a gyógyszerhatást, de előfordul, hogy a metabolit farmakológiai hatása az anyavegyületével megegyező, ebben az esetben aktív metabolitról beszélünk. Lehetséges az is, hogy a gyógyszermolekula eredeti formájában hatástalan (ún. „prodrug”), és csak a szervezetben alakul át farmakológiailag aktív molekulává. Egyes esetekben a metabolizmus során válnak az eredetileg ártalmatlan vegyületek toxikus, mutagén, esetleg karcinogén termékké [Rodríguez-Antona és Ingelman-Sundberg 2006].

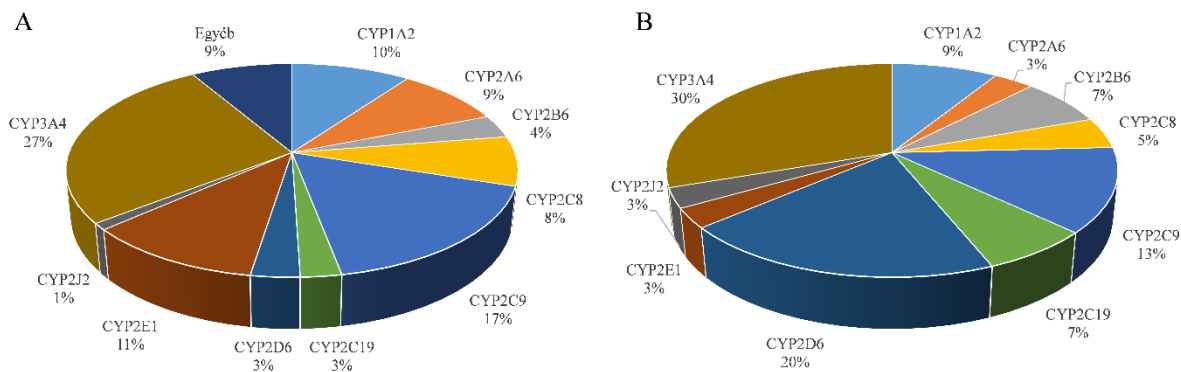
A CYP enzimek a hem-tartalmú monooxigenázok közé tartoznak, melyek a szubsztrátok oxidációjához a molekuláris oxigén egyik oxigénatomját használják. Szubsztrát-specifitásuk átfedő és rendkívül széles. Változatos reakciókat képesek katalizálni, mint hidroxilezés, S-, N-oxid és epoxid-képzés, O-, N-, S-dealkilezés, dehidrogénezés. Az átalakítandó szubsztrát a nyugalmi állapotban lévő CYP enzimhez kapcsolódik, melynek következtében olyan szerkezeti változások következnek be, melyek az alapállapotban a Fe^{3+} által koordinált vízmolekula kilépéséhez és a Fe^{3+} ion redukációjához (Fe^{2+} -vé) vezetnek. A redukált Fe^{2+} köti az oxigénmolekulát, mely így szuperoxidot képez ($O_2^{\bullet-}$), majd újabb elektron belépésével hem-peroxo komplex (O_2^-) alakul ki. Az elektronokat a NADPH-citokróm P450 oxidoreduktáz

szolgáltatja NADPH-t használva elektrononorként. Végül két proton belépése után egy oxigén vízkilépéssel távozik, a másik oxigén átkerül a szubsztrátra, majd az átalakított szubsztrát kilépésével az enzim visszakerül alapállapotba (2. ábra) [Vaz 2003].



2. ábra. A CYP enzimek katalitikus ciklusa [Tang *et al.* 2017]

Jelenlegi ismereteink szerint a humán genom 57 CYP gént és 58 pszeudogént tartalmaz, melyek 18 családot és 44 alcsaládot alkotnak. Bár a legtöbb CYP enzim specifikus endogén funkcióval bír, melyek között példaként említhetjük szteroid hormonok, prosztaglandinok és epesavak bioszintézisében való részvételüket [Nebert és Russel 2002], csak kb. tucatnyi, a CYP1-3 családba tartozó enzim felelős a xenobiotikumok és gyógyszerek metabolizmusáért. A széles és átfedő szubsztrát-specifitásuk ellenére klinikailag releváns koncentráció-tartományban egy adott hatóanyag lebontásában többnyire egy, vagy csak néhány enzim vesz részt, ami korlátozza a gyógyszer-metabolizáló rendszer kapacitását. A xenobiotikumok lebontásában részt vevő CYP-ek relatív mennyiségét a májban és a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepüket a 3. ábra szemlélteti [Zanger és Schwab 2013].



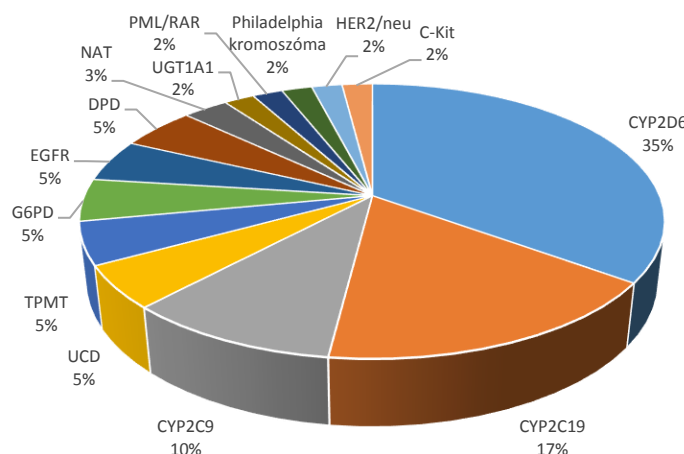
3. ábra. Hepatikus CYP izoenzimek relatív mennyisége (A) és gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepe (B) [Zanger és Schwab 2013].

2.4 CYP expressziót és enzimfunkciót befolyásoló tényezők

A CYP enzimek tudományos vizsgálatának jelentőségét egyértelműen az enzimek aktivitásában megfigyelhető nagy egyéni különbségek adják, mely minden, a gyógyszer-metabolizmusban részt vevő CYP-et kivétel nélkül jellemez. Korábbi tanulmányok alapján a CYP aktivitások egyéni eltérései a 20-szorostól (CYP2E1) akár a több mint 100-szorosig (CYP3A4) terjedhetnek [Gao *et al.* 2016; Shimada *et al.* 1994, Westlind-Johnsson *et al.* 2003]. Ez és a már ismert tény, hogy klinikailag egy gyógyszervegyület metabolizmusában csak egy vagy néhány CYP vesz részt, az egyének között eltérő gyógyszer-vérszinteket, eliminációs sebességet, farmakológiai hatást és mellékhatásokat eredményezhet. Ezért a gyógyszer-metabolizmusban mutatkozó rendkívül nagy egyéni eltérések hátterének felderítése jelenleg is a tudományos kutatások középpontjában áll, hiszen ezek ismerete javíthatja a személyre szabott gyógyszerelés hatékonyságát és a gyógyszerbiztonságot.

A gyógyszer-metabolizáló képesség kialakításában több tényező játszik szerepet, melyek között megkülönböztethetünk genetikai és nem-genetikai faktorokat. Számos CYP gént jelentős genetikai polimorfizmus jellemez, mely befolyásolhatja a gén funkcióját, transzkripcióját, az mRNS érését vagy az enzimfehérje aktivitását [Ingelman-Sundberg *et al.* 2007]. Általában egy bázist érintenek (single nucleotide polymorphism - SNP), mely többnyire báziscserét jelent (esetleg báziskiesést), azonban előfordulnak génkópiaszám-variációk is, mint a teljes gén deléciója, duplikációja/multiplikációja [Johansson és Ingelman-Sundberg 2008]. Az allélgyakoriságok és a fenotípus gyakoriságok az egyes populációk között eltéréseket mutatnak [Zhou *et al.* 2017]. A jelentős polimorfizmussal rendelkező CYP genotípusok (pl. CYP2C19, CYP2D6) alapján lehetőség van a fenotípus becslésére. Így a működésképtelen allélokat homozigóta formában hordozó egyének gyenge metabolizálóknak (poor metabolizer

– PM), míg a populációban többnyire leggyakrabban előforduló homozigóta vad, tehát működőképes allélokkal rendelkezők extenzív metabolizálóknak (EM) tekinthetők. A csak egy működőképes CYP allélt hordozók csökkent metabolikus kapacitással rendelkeznek, és intermedier metabolizálók (IM) közé soroljuk. Előfordulhat fokozott transzkripciót kiváltó polimorfizmus a gének promóter régiójában, esetleg teljes gén duplikáció/multiplikáció, melyek a génkifejeződés fokozásával ultragyors metabolizáló (UM) fenotípust válthatnak ki [Zanger *et al.* 2008]. A személyre szabott gyógyászat a gyógyszer-hatékonyság javítása és a káros mellékhatások elkerülése érdekében igyekszik a genetikai-alapú gyógyszer-alkalmazást támogatni. E célból dolgozott ki a CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) számos hatóanyag/gén párra útmutatásokat a genotípus-alapú gyógyszerelés klinikai alkalmazásához [<https://cpicpgx.org/guidelines/>], mely ajánlások nagyrészt CYP géneket érintenek (4. ábra).



4. ábra. Egyes farmakogénekkal kapcsolatos gyógyszer-alkalmazási ajánlások százalékos megoszlása.

C-Kit: proto-onkogén tirozin kináz Kit; DPD: dihidropirimidin dehidrogenáz; EGFR: humán epidermális növekedési faktor; G6PD: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz; HER2/neu: humán epidermális növekedési faktor 2; NAT: N-acetil transzferáz; PML/RAR: promielocitás leukemia/retinolsav receptor; TPMT: tiopurin S-metiltranszferáz; UCD: karbamidciklus rendellenesség; UGT1A1: uridin-difoszfát-glükuronil transzferáz 1A1. [Frueh *et al.* 2008]

Működőképes CYP allélok esetén azonban előtérbe kerülnek a fenotípus nem-genetikai befolyásoló tényezői. A különböző izoenzimek aktivitását a genetikai adottságokon felül számos külső és belső tényező módosíthatja indukció, represszió vagy enzimgátlás révén.

Bizonyos xenobiotikumok a sejtekbe kerülve képesek a CYP gének kifejeződését receptorfüggő mechanizmussal, nukleáris receptorok bevonásával fokozni. A xenobiotikum hozzáköt

és aktiválja a nukleáris receptort (megjegyzendő, hogy néhány esetben nem szükséges a ligand nukleáris receptorhoz kötődése az aktiváláshoz, pl. CAR aktiválása fenobarbitállal), mely dimerizációs partneréhez kapcsolódik (homo- vagy heterodimer), majd bejut a sejtmagba. A ligand-aktivált dimer a CYP gének promóter régiójának meghatározott szabályozó szakaszához (AGGTCA ismétlődő szekvencia) köt, és fokozza a transzkripciót. A szabályozó szakasz ismétlődő szekvenciáit változó számú bázis választja el, orientációjuk lehet egyirányú (direct repeat – DR), fordított (everted repeat – ER) vagy ellentétes (inverted repeat – IR) [Prakash *et al.* 2015].

A nem és a kor szintén kihat a CYP expresszióra. Példaként említhetjük a CYP2C9-et, melynek jelentősége valproát terápiában 15 év alatti gyerekeknél kimutatható volt, míg felnőtteknél elhanyagolható [Tóth *et al.* 2015; Monostory *et al.* 2019]. A gyógyszeres kezelés, táplálkozás, dohányzás, alkohol-fogyasztás és a betegségek (pl. cukorbetegség, fertőzés, gyulladás, máj- és veseelégtelenség, daganatos megbetegedés) lényeges szerepet játszanak az aktuális CYP aktivitás kialakításában [Parkinson *et al.* 2013], és a genotípus alapján várhatótól átmenetileg eltérő fenotípust alakíthatnak ki. Ez utóbbi jelenséget fenokonverciónak nevezzük [Shah és Smith 2014].

Az enzimaktivitás csökkenése két módon valósulhat meg: 1) valamilyen környezeti faktor egyrészt csökkentheti a génexpressziót (represszió), 2) másrészt gátolhatja vagy inaktíválhatja magát az enzimfunkciót. CYP-ek represszióját figyelték meg gyulladásos folyamatok és daganatos betegségek kísérőjeként, mely bár összefüggésbe hozható számos gyulladásos faktor jelenlétével [Morgan *et al.* 2008], a legtöbb kapcsolódó tanulmány az interleukin-6 (IL-6) kiemelkedő szerepére világított rá (1. táblázat). HIV-fertőzött, máj- és daganatos betegségben szenvedő betegeknél a CYP2C19 és CYP2D6 PM-ek aránya jelentősen meghaladta a genotípus alapján várt PM arányt, melyet a CYP gének gyulladásos faktorok miatt bekövetkező repressziójával hoztak kapcsolatba [Jones *et al.* 2010; Rost *et al.* 1995; Helsby *et al.* 2008].

1. táblázat. A citokinek hatása a gyógyszer-metabolizáló CYP aktivitásokra [Shah és Smith 2015]

Citokin	CITOKRÓM P450								
	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C18	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	CYP2E1
IL-1	↓	↓↔	↓	↔	↔	↔		↓	↓
IL-2	↓	↓			↓	↓		↓	↓
IL-4	↓	↑						↑↔	↑
IL-6	↓	↓	↓	↔	↓	↓		↓	↓
IL-10		↔			↓			↓↑	
TNF-A	↓	↑↓↔	↓	↔	↔	↓↔		↓	↓
IFN-A	↓								
IFN-A-2B	↓					↓	↓		↓
IFN-Γ	↓	↓	↓	↔	↔	↔		↓	
TGF	↓	↑↓↔	↓	↔	↓	↓		↓	

Fenokonverziót váltanak ki a CYP enzimek működését gátló vegyületek, amelyek csökkenthetik az aktuális enzimaktivitást, így átmeneti IM vagy PM fenotípust eredményeznek [Shah és Smith 2014]. A gyógyszer-interakciók háttérében leggyakrabban valamilyen CYP enzim inhibíciója áll. Az enzimgátlás lehet reverzibilis vagy irreverzibilis. Kompetitív reverzibilis gátlás esetén két szubsztrát verseng ugyanazon CYP enzim aktív helyéért. Például az omeprazol és a diazepam CYP2C19 szubsztrátok, együttes alkalmazásuk esetén az omeprazol csökkenti a diazepam plazma clearance-t és növeli a felezési idejét [Wedemeyer és Blume 2014]. A CYP2C19 aktív helyéért történő versengést támasztja alá, hogy a PM genotípusú egyéneknél (akiknél CYP2C19 enzim nem expresszálódik) az omeprazol nem befolyásolja a diazepam kinetikáját. Nem kompetitív reverzibilis gátlás esetén a gátlószer nem szubsztrátja az adott enzimnek, tehát nem az aktív helyhez, hanem egy allosztérikus kötőhelyhez kötődik. Az enzim-inhibítor komplexben azonban olyan szerkezeti változások játszódhatnak le, melyek megakadályozzák a szubsztrát kötődését az aktív helyhez. Ismert példaként szolgál nem kompetitív inhibícióra a specifikus CYP2D6 gátlószerként gyakran használt kinidin. A dextrometorfán O-demetilezését a CYP2D6 katalizálja. A kinidin és a dextrometorfán együttes szedése mellett - a CYP2D6 enzimet nem expresszáló PM genotípusú egyénekhez hasonlóan - csökkent dextrometorfán clearance-t tapasztaltak. Bár a kinidint nem alakítja át a CYP2D6, mégis erős gátlószer (K_i ~100 nM). Alapvető különbség a kompetitív és a nem kompetitív gátlás között, hogy míg előbbi esetben a szubsztrát-koncentráció emelésével a gátló hatás megszüntethető, addig utóbbi esetben ez nem lehetséges. Megkülönböztetünk továbbá unkompetitív gátló mechanizmust, amikor a gátlószer csak a már kialakult enzim-szubsztrát komplexhez képes kapcsolódni. Meglehetősen ritka típus, klinikai jelentősége nem számottevő [Coleman 2010]. Mechanizmus alapú gátlásról akkor beszélünk, amikor a CYP enzim egy xenobiotikum átalakítása során olyan metabolitot képez, mely az

anyavegyületnél erősebb gátlószer. Néhány esetben a képződött metabolit egy erősebb reverzibilis inhibitor, más esetben a CYP hem csoportjához kovalensen kötődő irreverzibilis gátlószer alakul ki (szuicid inaktivátor vegyületek). Ilyen irreverzibilis inhibitor például a gemfibrozil glükuronid metabolitja (CYP2C8) [Backman *et al.* 2016] és a tiklopidin (CYP2C19) [Ha-Duong *et al.* 2001].

2.4.1 CYP2C19

A humán CYP2C alcsalád négy homológ gént foglal magába, melyek a 10. kromoszómán (10q23.33) helyezkednek el a következő sorrendben: centromer–*CYP2C18*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2C8*-telomer. A májban legnagyobb mennyiségben a *CYP2C9* expresszálódik, és bár a *CYP2C19* csak kis részét teszi ki a máj CYP-készletének (~3%), a gyógyszer-metabolizmusban betöltött szerepe jelentős (3. ábra). Szubsztrátjai között találunk protonpumpa- és véralvadás-gátlókat, antiepileptikumokat, antidepresszánsokat, illetve a malária kezeléséhez használt proguanilt (2. táblázat). Endogén szubsztrátjai a progeszteron és a melatonin. A mefenitoin *S*-enantiomerének 4'-hidroxilezése specifikus reakciója, melyet gyakran alkalmaznak a *CYP2C19* aktivitás jellemzésére, míg tiklopidinnel szelektíven gátlható az enzim működése [Parkinson *et al.* 2013]. A *CYP2C19* fontos szerepet játszik a káros mellékhatások és a gyógyszer-interakciók kialakulásában.

2. táblázat. Fontosabb *CYP2C19* szubsztrátok [Rendic 2002]

CYP2C19 SZUBSZTRÁTOK	
Barbiturátok	hexobarbital, mefobarbital, fenobarbital
Benzodiazepinek	diazepam, flunitrazepam, quazepam, clobazam
Protonpumpa-gátlók	omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol
Szelektív szerotonin visszavétel gátlók	citalopram, fluoxetin, sertralin
Triciklusos antidepresszánsok	imipramin, amitriptilin, nortriptilin,
Egyéb gyógyszerek	fenitoin, <i>S</i> -mefenitoin, moklobemid

A *CYP2C* alcsaládból a *CYP2C19* volt az első enzim, melyet felfedeztek, köszönhetően az *S*-mefenitoin metabolizmusában megfigyelt változatos fenotípusoknak [Küpfér és Preisig 1984]. A *CYP2C19* enzimaktivitásokat rendkívül nagy egyéni eltérések jellemzik, melyet elsősorban genetikai polimorfizmusára vezetnek vissza [Zanger és Schwab 2013], ezért a populációt általában négy fenotípus csoportra osztják: gyenge (PM), intermediér (IM), extenzív (EM) és ultragyors (UM) metabolizálókra. A *CYP2C19* enzimet 9 exon kódolja, és a génnek eddig 35 allélvariánsát azonosították [<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19>], melyek közül többnek enzimfunkciót befolyásoló hatása ismert (3. táblázat). A kaukázusi populációban

leggyakrabban előforduló allélvariáns a *CYP2C19**2, melyet hibás mRNS érés és teljes enzimhiány jellemez, amit egy, az 5. exonban található SNP (G>A báziscsere) vált ki. A *CYP2C19**3 variánsban található egyik SNP (G>A báziscsere) miatt korai stop kodon alakul ki, így ez szintén teljes enzimhiányt okoz. A *CYP2C19**3 ázsiai populációkra jellemző variáns, kaukázusi populációkban ritkán fordul elő (<1%). A *CYP2C19**4 allélvariáns ATG helyett GTG start kodont hordoz, mely enzimhiánnyal jár [Desta *et al.* 2002]. További klinikai jelentőséggel bíró allél a *CYP2C19**17, mely egy promóter régióban jelenlévő SNP következtében feltehetően fokozott génexpresszióhoz és enzimaktivitáshoz vezet, de a mechanizmus háttere egyelőre nem tisztázott [Sim *et al.* 2006].

3. táblázat. A *CYP2C19* gén leggyakrabban előforduló klinikailag jelentős polimorfizmusai [Zhou *et al.* 2017; Fricke-Galindo *et al.* 2016]

<i>CYP2C19</i> allélvariáns	Hatást kiváltó SNP	mRNS változás	Enzim- aktivitás	Allélgyakoriság (%)		
				Európai	Ázsiai	Afrikai
<i>CYP2C19</i> *2	19154G>A	splicing hiba	nincs	12-18	22-32	10-17
<i>CYP2C19</i> *3	17948G>A	stop kodon	nincs	<1	3-7	<1
<i>CYP2C19</i> *4	1A>G	GTG start kodon	nincs	<1	<1	<1
<i>CYP2C19</i> *17	-806C>T	fokozott transzkripció	fokozott	20-22	<2	15-27

A *CYP2C* gének transzkripciója számos nukleáris receptor szabályozása alatt áll, melyeknek egy része xenobiotikumokkal aktiválható. A *CYP2C19* promóter régiójában megtalálhatóak a konstitutív androsztán receptorra (CAR), a pregnán X receptorra (PXR) és a glükokortikoid receptorra (GR) érzékeny szakaszok, melyek a xenobiotikum aktiváció után homo- vagy heterodimert képezve kapcsolódnak a promóter régió megfelelő szakaszaihoz, majd további szabályozó koaktivátorok segítségével módosítják a kromatin szerkezetet, és fokozzák a transzkripciót. CAR aktiváló xenobiotikumok közé tartozik pl. a fenobarbitál, amely ugyan nem kötődik a CAR-hoz, de elősegíti a nukleáris receptor sejtmagba jutását, így növeli az indukciós hatást. A PXR legismertebb aktivátora a rifampicin. A szabályozó mechanizmus során a CAR és a PXR heterodimert képez a retinoid X receptorral (RXR), míg a GR, melynek aktivátora például a dexametazon, homodimerként vesz részt az indukciós mechanizmusban. A *CYP2C19* konstitutív expressziója több, elsősorban a májban kifejeződő transzkripciós faktor szabályozása alatt áll, melynek két legfontosabb képviselője a hepatikus nukleáris faktorok közé tartozó HNF4 α és a HNF3 γ [Chen és Goldstein 2009].

Káros mellékhatást okozó gyógyszer-interakciók hátterét vizsgálva, (melyek során valamely hatóanyag megváltoztatja egy párhuzamosan alkalmazott hatóanyag farmakodinámiás vagy farmakinetikai tulajdonságait) számos esetben derült fény a CYP2C19 érintettségére. Az interakciók egyik jellemző tagja protonpumpa-gátló (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol), melyet gyakran alkalmaznak párhuzamos terápiában például CYP2C19 szubsztrát véralvadásgátlók (klopidogréll, warfarin), a szelektív szerotonin visszavétel gátló fluvoxamin vagy a monoamin-oxidáz gátló moklobemid mellett. A gyógyszer-interakciók kialakulása függ az egyén genotípusától: működőképes *CYP2C19* allélok jelenlétében az interakció erősebb, mint egy vagy két működésképtelen allélvariáns jelenlétében [Bahar *et al.* 2017].

2.4.2 CYP2D6

Az 1950-es évek végén az Egyesült Államokban klinikai vizsgálatok során azt találták, hogy a spartein az oxitocinhoz hasonlóan alkalmazható szülés beindítására, azonban a szülő nők kb. 7%-ánál a hatás időtartama és intenzitása drámaian megnőtt, sőt, néhány esetben a spartein használata a magzat halálához vezetett. A vérnyomás-csökkentő debrizokvin terápiára a betegek 5-10%-a jelentős és elhúzódó hipotenzióval reagált. A nem-várt reakciók hátterében egy CYP enzimet kódoló gén polimorfizmusa állt, mely enzim eleinte a specifikus reakció alapján debrizokvin-hidroxilázként, majd CYP2D6-ként jelent meg a szakirodalomban [Parkinson *et al.* 2013]. A CYP2D6 enzimfehérjét 497 aminosav alkotja, melyet 9 exon kódol. A máj CYP enzimek készletének csak kb. 2-3%-át teszi ki. Bár a CYP2D6 extrahepatikus jelenléte a gyógyszer-lebontás szempontjából másodlagos, viszonylag számottevő expressziója az agyban felveti a szerepét a pszichoaktív szerek és a központi idegrendszer neurotranszmittereinek metabolizmusában. Ezenkívül kapcsolatot találtak a *CYP2D6* polimorfizmusai és bizonyos viselkedési minták között, azonban az agyban betöltött pontos funkciója egyelőre nem tisztázott és jelenleg is intenzíven kutatott [Stingl *et al.* 2012; Ingelman-Sundberg *et al.* 2014; Niwa *et al.* 2017]. A hepatocitákban jellemző alacsony relatív expressziója ellenére fontos szerepet játszik a gyógyszer-metabolizmusban, hiszen a forgalomban lévő hatóanyagok legalább 20%-ának lebontásában részt vesz. Főbb szubsztrátjai közé tartoznak antiarritmiás szerek, vérnyomás-csökkentő béta-blokkolók, triciklikus és második generációs antidepresszánsok, antipszichotikumok, számos opioid, valamint az emlődaganat kezelésére alkalmazott szelektív ösztrogénreceptor-modulátor tamoxifen (4. táblázat). Több specifikus szubsztrát is alkalmazható a CYP2D6 enzimaktivitás meghatározására *in vitro* és *in vivo* egyaránt, ilyen a dextrometorfán, a metoprolol, a tramadol és a már említett debrizokvin és spartein. Számos gátlószere ismert, kinetikai vizsgálatokban

gyakran használt specifikus inhibitora pl. a kinidin vagy a metadon. A CYP2C19-hez hasonlóan a CYP2D6 aktivitásokban szintén rendkívül nagy egyéni eltérések tapasztalhatók, ezért egy adott populációt jellemzően négy fenotípus csoportra osztunk: gyenge (PM), intermedier (IM), extenzív (EM) és ultragyors (UM) metabolizálókra.

4. táblázat. CYP2D6 szubsztrátok és gátlószerek [He *et al.* 2015; Zanger *et al.* 2004]

CYP2D6 SZUBSZTRÁTOK	
Analgetikumok/antitusszív hatású szerek	kodein, dextrometorfan, dihidrokódein, etilmorfin, hidrokodon, norkodein, oxikodon
Anti-ADHD szerek	atomoxetin
Antiarritmikumok	aprindin, enkainid, flekainid, mexiletin, N-propilajmalin, prokainamid, propafenon, spartein
Antidemencia szerek	galantamin, nicergolin
Triciklikus antidepresszánsok	amitriptylin, klomipramin, dezipramin, imipramin, nortriptylin
Egyéb antidepresszánsok	citalopram, dezmetilcitalopram, fluoxetin, fluvoxamin, maprotilin, mianszerin, minaprin, mirtazapin, paroxetin, venlafaxin
Antidiabetikumok	fenformin
Antiösztrogének	tamoxifen
Antihipertenzív szerek	debrizokvin, guanoxan, indoramin
Antiemetikumok	dolaszerton, ondanszerton, tropiszerton
Antihisztaminok	mekvitazin, prometazin
Antipszichotikumok	aripiprazol, haloperidol, perfenazin, risperidon, tioridazin, zuklopentixol
Étvágycsökkentők	dexfenfluramin
Béta-blokkolók	alprenolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, karvediol, metoprolol, propranolol, timolol
Kalcium antagonisták	perhexilin
MAO-inhibitorok	amiflamin, brofaromin
Rekreációs szerek	metoxiamfetamin, MDMA
Vazodilatátorok	cinnarizin, flunarizin
CYP2D6 INHIBÍTOROK	
Analgetikumok/antitusszív hatású szerek	kinidin, metadon
Antidepresszánsok	fluoxetin, paroxetin
Antipszichotikumok	levomepromazin, trifluoperidol
Diaforetikum, emetikum	lobelin
Alkaloidok	ajmalicin, berberin, koniin, ergotamin, gramin, harmalin, laudanozin, szempervirin, vinkamin, vinblasztin

ADHD: figyelemhiányos hiperaktív zavar; MAO: monoamin-oxidáz; MDMA: 3,4-metiléndioxi-N-metil-amfetamin.

A CYP2D alcsalád egyetlen fehérjét kódoló génje a *CYP2D6*. A CYP2D lókuszt a 22-es kromoszómán helyezkedik el (22q13.1), és a kódoló gén mellett két, a *CYP2D6*-tal homológ pszeudogént (*CYP2D7P* és *CYP2D8P*) is tartalmaz. *CYP2D7* mRNS expresszálódik a májban, de az 1. exonban történt inszerció következtében nem fejeződik ki fehérje [Zhou 2009]. A *CYP2D8P* egy valódi pszeudogén, számos mutációt tartalmaz, ami a génexpresszió teljes hiányát eredményezi. A *CYP2D6* genetikai polimorfizmusa a farmakogenetika egy intenzíven kutatott területe. Napjainkig több mint 100 allélvariánst azonosítottak, közöttük számos, a gén funkcióját befolyásoló, és így az enzimaktivitásra kiható változat ismert (5. táblázat).

A *CYP2D6*1* és *CYP2D6*2* funkcionális allélok tekintjük vad típusúnak, melyek néhány, a gén működését nem befolyásoló bázisban különböznek. Az európai fehér (kaukázusi) populációban leggyakoribb működésképtelen allél a *CYP2D6*4*, amely egy intronban található SNP (1846G>A) következtében az mRNS érés hibáját idézi elő, így nem keletkezik *CYP2D6* fehérje. A *CYP2D6*4* allél előfordulási gyakorisága a kaukázusi, afrikai és amerikai populációkban rendkívül magas (12-16%), míg a kelet-ázsiai populációkban az 1%-ot sem éri el. A leolvasási keret eltolódásához, így működésképtelen génhez vezető *CYP2D6*3* és *CYP2D6*6* allélok kizárólag az európai populációkra jellemzőek, allélgyakoriságuk rendre 4% illetve 2% [Zhou *et al.* 2017]. A géndeléciót jelentő *CYP2D6*5* allél frekvenciája világszerte 3-6%-ra tehető. A kaukázusi populációban a *CYP2D6*3*, **4*, **5* és **6* variánsok felelősek a genetikailag meghatározott PM fenotípusok 93-97%-ért [He *et al.* 2015]. A fehér populáció tagjainak 10-15%-a hordoz részlegesen defektív allélvariánsokat (pl. **41*, **9*, **10*, **17*), ami egy másik ugyanilyen vagy egy funkcionális alléllal kombinációban az IM fenotípus kialakulását eredményezi. IM fenotípust okoz egy funkcionális és egy működésképtelen allél kombinációja is. Az intermedier metabolizálók csoportja minden populációban megtalálható, de a kialakulásáért felelős mutációk eltérőek. A *CYP2D6*41* allél a kaukázusi populációban viszonylag gyakori, a 6. intronban található SNP következtében károsodik az mRNS splicing, ezáltal csökken a funkcionális mRNS-ek mennyisége, így a fehérjemennyiség és *CYP2D6* aktivitás is [Toscano *et al.* 2006]. Az afrikai és ázsiai etnikumokban a *CYP2D6*17* és a *CYP2D6*10* allél az uralkodó. A *CYP2D6*17* allél előfordulási gyakorisága kb. 20% az afrikai populációban, míg a *CYP2D6*10*-é egészen 60%-ig terjed az ázsiai populációkban [Zhou *et al.* 2017]. A *CYP2D6*10* esetén egy C>T báziscsere következtében prolin-szerin aminosavcsere következik be, így a kifejeződő enzim a vad típusnál kisebb affinitást mutat a *CYP2D6* szubsztrátokhoz [Fukuda *et al.* 2000]. A CYP2D lókuszt nagy strukturális variabilitással rendelkezik. A kromoszómák egyenlőtlen átkapcsolása a *CYP2D6* gén és a *CYP2D* pszeudogének között géndelációhoz, duplikációhoz és rekombinálandó gének kialakulásához

(pl. hibrid génekhez) vezet. A *CYP2D6* gén duplikációját először a *CYP2D6*2* allél esetében mutatták ki, ez volt az elsőként leírt stabilan duplikálódott gén a humán genomban. Később a *CYP2D6*1*, *4, *6, *10, *17 *29, *35, *41, *43 és a *45 alléloknál is kimutattak duplikációt, aminek jelentősége abban rejlik, hogy nem mindig a működőképes enzimet kódoló gén duplikálódik, ezt pedig a fenotípus becslése során figyelembe kell venni [Gaedigk *et al.* 2007]. A génduplikációk előfordulása a fehér populációban 1 és 9% közé esik, míg néhány arab, kelet-afrikai és Csendes-óceán térségi populációban eléri a 10, sőt az 50%-ot is. Ennek hátterében az állhat, hogy ezen populációk növényi alkaloidokban dús táplálkozása olyan szelekciós nyomást jelentett az evolúció során, ami az alkaloidok metabolizmusáért felelős *CYP2D6* enzim nagyobb aktivitással járó génvariánsainak kedvezett [Ingelman-Sundberg 2005]. Több *CYP2D6* allélban (aktív: *CYP2D6*2A*, *35, *51, null allél: *CYP2D6*2I*, *31,*56, még nem jellemzett aktivitású: *CYP2D6*63*, *71) megtalálható egy, a gén promoter régiójában bekövetkezett pontmutáció, aminek funkcionális hatása még nem teljesen tisztázott. A -1584C>G polimorfizmust génexpressziós változásokkal hozták kapcsolatba. Az olyan -1584G-t hordozó egyénekben, akik rendelkeznek egy vagy két aktív génnel (*CYP2D6*1* és *CYP2D6*2*), magasabb *in vivo* enzimaktivitást és kisebb gyógyszerválaszt mértek [Llerena *et al.* 2013], továbbá májszövetben a -1584G homozigótákhoz és heterozigótákhoz képest feleakkora *CYP2D6* fehérjemennyiséget mértek a -1584C homozigóta esetben [Pan *et al.* 2017]. A közelmúltban Wang és munkatársai újabb SNP-t azonosítottak jóval távolabbi szabályozó régióban, melyet a *CYP2D6* fokozott expressziójával hoztak összefüggésbe [Wang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015]. Mivel a *CYP2D6* UM fenotípus csak részben magyarázható génduplikációval, ezért jelenleg is intenzív kutatások folynak a génexpressziót befolyásoló egyéb polimorfizmusok felderítésére.

5. táblázat. A *CYP2D6* leggyakrabban előforduló polimorfizmusai [Zhou *et al.* 2017; Zanger és Schwab 2013]

<i>CYP2D6</i> allélvariáns	Hatást kiváltó SNP	mRNS változás	Enzim- aktivitás	Allélfrekvencia (%)		
				Európai	Ázsiai	Afrikai
<i>CYP2D6*3</i>	2549delA	frameshift	nincs	1-4	<1	<1
<i>CYP2D6*4</i>	1846G>A	splicing hiba	nincs	16	<1	12
<i>CYP2D6*5</i>	teljes gén deléción	-	nincs	3	6	4
<i>CYP2D6*6</i>	1707delT	frameshift	nincs	2	-	-
<i>CYP2D6*10</i>	100C>T	-	csökkent	1-2	30-60	6
<i>CYP2D6*41</i>	2988G>A	splicing hiba	csökkent	9	1-6	1-6
Duplikáció/ multiplikáció			fokozott	1-9	1	9-30

A *CYP2D6* gén szabályozó régiójában nem találhatóak meg a legtöbb CYP gén indukciójában részt vevő nukleáris receptor-kötő szakaszok (CAR, PXR, GR), tehát jelenlegi ismereteink szerint a génexpresszió nem indukálható xenobiotikumokkal. A konstitutív expresszió szabályzásában csak néhány transzkripciós faktor szerepét állapították meg, ezek közé tartozik a HNF4 α és a C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein). Egy humán májszövet mintákon végzett vizsgálat szerint szignifikáns korreláció mutatható ki a HNF4 α mRNS szintek és a mikroszomális CYP2D6 enzimaktivitások között [Yang *et al.* 2010]. A C/EBP szerepét bizonyítja egyrészt, hogy a C/EBP expresszió megszüntetése csökkenti a *CYP2D6* átíródását HepG2 sejtvonalakban, másrészt azonosították a transzkripciós faktor kötőhelyét a *CYP2D6* promóter régiójában [Matsunaga *et al.* 2012].

A CYP2D6 enzim által metabolizált hatóanyagok terápiájának személyre szabásához a feltételezett genetikai meghatározottsága miatt elsősorban farmakogenetikai megközelítést alkalmaznak, azonban az esetek nem elhanyagolható részében kizárólag a genotípus nem nyújt elégséges információt a fenotípus becsléséhez. Az a tény, hogy egy adott genotípus csoport CYP2D6 enzimaktivitásai széles tartományban változnak, különösen az egyének többségét kitevő intermedier és extenzív metabolizáló csoportokban, a fenotípus más, eddig nem ismert befolyásoló tényezőit sejteti a háttérben.

2.4.3 CYP3A4/5

A CYP3A alcsaládba tartozó enzimek találhatóak meg a legnagyobb mennyiségben a humán májban. Az alcsaládba tartozó CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 és CYP3A43 enzimeket kódoló gének a 7-es kromoszómán (7q22.1) helyezkednek el, és a metabolizmusban betöltött szerepük jelentősen eltér. A CYP3A43 kis részét (<6%-át) teszi ki a CYP3A enzimeknek, és funkciójáról szegényesek az ismereteink [Daly 2006]. A CYP3A7 elsősorban magzati korban expresszálódik, ekkor a májban ez a legnagyobb mennyiségben kifejeződő CYP3A enzim, azonban születés után fokozatosan a CYP3A4 veszi át a szerepét, mely folyamat részletei egyelőre nem ismertek [Zanger és Schwab 2013]. A CYP3A4 a legjelentősebb gyógyszer-metabolizáló enzim, köszönhetően széles szubsztrát-specifitásának és magas expressziójának a májban illetve a vékonybélben. Mindez kiemelkedően nagy szereppel bír az ún. 'first-pass' metabolizmusban, ezáltal az orálisan adagolt hatóanyagok farmakokinetikájában. Például a grapefruit lé okozta nem várt gyógyszerreakciók hátterében a CYP3A4 gátlása áll a gyümölcslemben található furanokumarin-származékok miatt, mely bizonyos orálisan alkalmazott, 'first-pass' metabolizmuson áteső hatóanyagok szokatlanul magas szérum-koncentrációját idézi elő [Parkinson *et al.* 2013]. A CYP3A5 és a CYP3A4 szekvenciája kb.

90% hasonlóságot mutat, szubsztrát-specifitásuk alapján nehezen megkülönböztethetők. Mindkét enzim hatalmas és flexibilis aktív centrummal rendelkezik, mely lehetővé teszi mind nagyméretű molekulák (pl. az immunszuppresszáns ciklosporin A és takrolimus, az antibiotikum eritromicin, vagy a kemoterápiás szer paklitaxel), mind kisebb vegyületek (pl. az ösztrogén-receptor antagonistá tamoxifen, sztatinok, benzodiazepinek, antidepresszánsok) kötődését. Funkciójukkal ellentétben szöveti megoszlásuk lényeges különbségeket mutat, hiszen bár a tüdőben, a vesében és az agyban mennyiségük összemérhető, a májban és a vékonybélben a CYP3A5 expressziója jelentősen alacsonyabb a CYP3A4-nél [Dutheil *et al.* 2008; Pavek és Dvorak 2008].

A *CYP3A4* genetikai polimorfizmusa csak részben ad magyarázatot az expresszióban és aktivitásban megfigyelhető variabilitásra [Sadee 2012]. A *CYP3A4*1B* allélvariáns bár részletesen tanulmányozott, szerepe a CYP3A4 fenotípus meghatározásában ellentmondásos. Az allélvariáns promóter régiójában található SNP-t (-392A>G) összefüggésbe hozták magasabb génextpresszióval, illetve *in vivo* enzimaktivitással, azonban más tanulmányok ezeket a megállapításokat nem tudták megerősíteni [Amirimani *et al.* 2003; Rodriguez-Antona *et al.* 2005; He *et al.* 2006; Perera 2010; Lolodi *et al.* 2017]. A *CYP3A4*1B* szerepének tisztázását nehezíti, hogy a *CYP3A5*1* vad alléllal kapcsolatosan öröklődik [Wang *et al.* 2011]. A *CYP3A4*22* allélvariáns esetében csökkent génextpressziót és enzimaktivitást írtak le, köszönhetően egy, a 6. intronban jelen lévő SNP-nek. A CYP3A4-gyel ellentétben a CYP3A5 metabolikus kapacitását elsősorban genetikai tényezők határozzák meg, melyeket jelentős etnikai különbségek jellemeznek. A *CYP3A5*3* allélvariáns - mely az enzim teljes hiányát okozza a kaukázusi populáció >90%-nál - egy intronban található SNP következtében korai stop kodont tartalmaz, így működésképtelen, csonka fehérjét eredményez [Zanger és Schwab 2013]. Működőképes *CYP3A5* allél jelenléte esetén (átfedő szubsztrát-specifitásuk miatt) aktivitása hozzáadódik a CYP3A4 aktivitásához, ezzel nem várt gyógyszer-hatást vagy hatás-elmaradást idézhet elő, különösen olyan hatóanyagok alkalmazásakor, melyekkel szemben a CYP3A5 a CYP3A4-nél nagyobb affinitást mutat (pl. tacrolimus) [Monostory *et al.* 2015]. A CYP3A4 és CYP3A5 leggyakrabban előforduló polimorf allélvariánsait és azok hatását a 6. táblázat foglalja össze.

6. táblázat. A *CYP3A4* és *CYP3A5* gének leggyakrabban előforduló polimorfizmusai [Zhou *et al.* 2017; Zanger és Scwab 2013]

CYP3A allélvariáns	Hatást kiváltó SNP	mRNS változás	Enzim- aktivitás	Allélgyakoriság (%)		
				Európai	Ázsiai	Afrikai
<i>CYP3A4*1B</i>	-392A>G	promóter	fokozott?	3-5	0	50-82
<i>CYP3A4*22</i>	15389C>T	intron 6	csökkent	3-8	1-4	<0,1
<i>CYP3A5*3</i>	6986A>G	korai stop kodon	nincs	88-97	66-75	12-35

A *CYP3A4* és *CYP3A5* génexpressziója összetett szabályzás alatt áll. A konstitutív expresszió kialakításában számos transzkripciós faktor részt vesz, pl. a C/EBP α , C/EBP β , HNF1 α , HNF3 γ és a HNF4 α [Lamba *et al.* 2010]. A xenobiotikumok által kiváltott indukcióban a PXR és CAR játszik fontos szerepet a már ismertetett módon (ld. 2.4.1 fejezet). A CYP3A transzkripció szabályzásában a GR közvetlenül, illetve a PXR/CAR-on keresztül közvetetten is részt vesz. Végül a D-vitamin receptor (VDR), melynek ligandja az 1 α ,25-dihidroxi-D-vitamin (a D-vitamin aktív metabolitja), a PXR/CAR-hoz hasonlóan az RXR-ral heterodimert képezve fokozza a *CYP3A* átíródást [Lolodi *et al.* 2017].

A CYP enzimaktivitások egyének között mutatkozó variabilitása a gyógyszerek farmakinetikájának eltéréseihez vezet, így a gyógyszeres terápia személyre szabásával elkerülhetővé válhat a hatás-elmaradás, illetve a káros mellékhatások kialakulása. A CYP enzimek bemutatásával igyekeztem rávilágítani a jelen ismereteink szerint a gyógyszermetabolizmus egyéni eltéréseinek hátterében fellelhető tényezőkre. A továbbiakban a klinikai vizsgálataink tárgyát képező súlyos pszichiátriai betegségekről, és ezek gyógyszeres terápiajának lehetőségeiről és problémáiról igyekszek áttekintést adni.

2.5 Pszichiátriai kórképek

A szkizofrénia egy súlyos pszichiátriai betegség, mely mélyreható következményekkel jár mind a beteg, mind a társadalom számára. Élettartam prevalenciája 0,5-1% körülire tehető [McGrath *et al.* 2008]. A betegség férfiaknál jellemzően 15-25, míg nők esetén 25-35 év között alakul ki [Fekete *et al.* 2010]. Krónikus jellege és korai kialakulása következtében rendkívül nagy közegészségügyi terhet jelent. Bár a szkizofrénia gyógyíthatatlan betegség, az esetek 10-15%-ában akár teljes felépülés is várható, azonban a betegek több mint 50%-a időszakosan, de hosszú távon pszichés problémákkal küzd. A munkanélküliségi arányuk 80-90%-os [Evensen *et al.* 2016], várható élettartamuk 10-20 évvel alacsonyabb az átlagosnál, ezenkívül a WHO (World

Health Organization) megállapítása alapján a szkizofrénia a rokkantság tíz leggyakoribb kiváltó oka között szerepel [National Collaborating Centre for Mental Health 2009].

Szkizofréniában az elmeműködés súlyos zavarai figyelhetők meg, melyek magukban foglalnak pozitív (hallucinációk, téveszmék), negatív (motiváció hiánya, beszűkült érzelmi élet, szegényes beszéd és gondolkodás, anhedónia), illetve kognitív (gondolkodás alaki zavara, memória-problémák) tüneteket. Míg a pozitív tünetek erősödhetnek és mérséklődhetnek a betegség lefolyása során, addig a negatív és kognitív tünetek krónikusan fennállnak, és elsősorban ezek hozhatók összefüggésbe a betegség hosszútávú szociális hatásaival [Owen *et al.* 2016]. A betegség kialakulásának háttere egyelőre nem tisztázott, genetikai és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszhatnak. Családokban halmozottan fordul elő, kialakulásának kockázata egyik szülő betegségére esetén 10%, míg két szkizofrén szülő esetén 34-40% [Fekete *et al.* 2010]. Környezeti kockázati faktorok tekintetében a betegség kialakulását összefüggésbe hozták pl. a magzat idegrendszerének kóros fejlődésével [Brown 2012; Meli *et al.* 2012; McGrath *et al.* 2010], gyermekkori sérelmekkel [Varese *et al.* 2012] és a bevándorlással is [Selten *et al.* 2007]. A szkizofrénia számos neurotranszmitterrel kapcsolatba hozható. Ismereteink szerint a dopamin, szerotonin, glutamát, noradrenalin és GABA (gamma-amino-vajsav) rendszer zavara szerepet játszik a betegség patogenezisében [Ayano 2016].

Szkizoaffektív zavar akkor diagnosztizálható, ha major depresszív, mániás vagy kevert epizódok a szkizofrénia tüneteivel egyidőben vannak jelen és egyformán kifejezettek, valamint a tünetek önmagukban nem elegendőek a szkizofrénia vagy az affektív zavar diagnózisához. Egy Olfson és munkatársai által közölt tanulmányban [Olfson *et al.* 2009] szkizoaffektív zavart közel fele olyan gyakran (42%) diagnosztizáltak, mint szkizofréniát, egy finn közlemény pedig élettartam prevalenciáját 0,32%-ra becsülte, és érdekes adat, hogy ugyanitt a nők érintettsége meghaladta a férfiakét [Perälä *et al.* 2007].

A bipoláris affektív betegséget különböző súlyosságú mániás, depressziós és kevert epizódok váltakozása jellemzi, hosszabb-rövidebb tünetmentes időszakok közbeiktatásával. A mániás epizód legalább egy hétig tartó abnormálisan emelkedett vagy ingerlékeny hangulattal jellemezhető, a depressziós epizódot ellenben lehangoltság, értéktelenség-érzet, csökkent gondolkodási és döntési képesség kíséri [EMMI 2016]. Élettartam prevalenciája a Magyarországi felnőtt lakosság körében a világon az egyik legmagasabb, 5,0%-ra tehető [Rihmer *et al.* 2016].

2.6 A pszichiátriai betegségek gyógyszeres kezelése

A pszichofarmakológia alapjait a klórpromazin 1952-es felfedezése teremtette meg. A klórpromazin az eredetileg féreghajtóként fejlesztett fenotiazin-származékok közé tartozik, azonban a vizsgálatok során felfigyeltek szedatív hatására, később pedig az első, ún. típusos antipszichotikumként alkalmazták. Az 50-es évek végén felfedezett típusos haloperidol hosszú ideig az antipszichotikus kezelés alapszere volt, mára azonban a második generációs, vagy más néven atípusos vegyületek kiszorították. A típusos antipszichotikumok erős D₂ receptor antagonisták, bár hatékonyak a szkizofrénia pozitív tüneteivel szemben, sajnos –köszönhetően erős dopaminreceptor affinitásuknak– meglehetősen gyakran okoznak súlyos extrapiramidális mellékhatásokat (EPS). A pszichofarmakológiában jelentős áttörést hozott az első atípusos szer, a klozapin bevezetése a 60-as években, mely egyrészt hatékonyabbnak bizonyult a korábbi vegyületeknél, másrészt ritkábban okozott EPS-t. Azóta számos antipszichotikumot vezettek be és alkalmaznak (pl. kvetiapin, risperidon, olanzapin, ziprazidon), melyek bár szerkezetileg különbözőek, közös jellemzőjük a dopamin-antagonista hatás. Egyéb receptorokhoz (pl. szerotonin, hisztamin, adrenerg, acetyl-kolin) való affinitásuk lényegesen eltér, mely elsősorban a mellékhatások vonatkozásában jelent különbségeket. A második generációs vegyületek csökkentik a pozitív tüneteket, mindemellett kedvező hatást gyakorolnak a negatív, depresszív és kognitív tünetekre is. Terápiás hatásukban a dopaminreceptor antagonizmus mellett a szerotonin-receptorokon kifejtett hatásnak is jelentőséget tulajdonítanak [Fekete *et al.* 2010]. Nemzetközi ajánlások alapján a második generációs antipszichotikumok az elsőként választandó szerek pszichotikus betegségekben. A szkizofrénia kezelésének nélkülözhetetlen eszköze a gyógyszeres terápia, melynek elsődleges célja a pszichotikus pozitív tünetek megszüntetése és ismételt megjelenésük megakadályozása [Kovács 2011]. A betegség hosszútávú kimenetelét tekintve, a betegek kb. 10-15%-a tünetmentessé válik, nagy részük esetén azonban a kezelések ellenére rendszeres visszaesés és pszichés panaszok jellemzőek, míg 10-15%-uknál krónikus, súlyos pszichózis alakul ki [Lehman *et al.* 2004].

A bipoláris betegség kezelésének első lépése az aktuális hangulati állapot felmérése, ugyanis lényegesen eltérő terápiás megközelítés indokolt mániás, hipomániás vagy depressziós epizód fennállása esetén [Grande *et al.* 2016]. A farmakoterápia gerincét hangulatstabilizálók (lítium, valproát, karbamazepin) és antipszichotikumok (kvetiapin, olanzapin) adják, antidepresszívumok monoterápiája kontraindikált, hangulatstabilizálókkal kombinációban is a lehető legrövidebb ideig és csak a depressziós tünetek fennállásáig adhatók [Rihmer *et al.* 2016]. Az antipszichotikumok közül a második generációs szerek preferáltak, akut antimániás

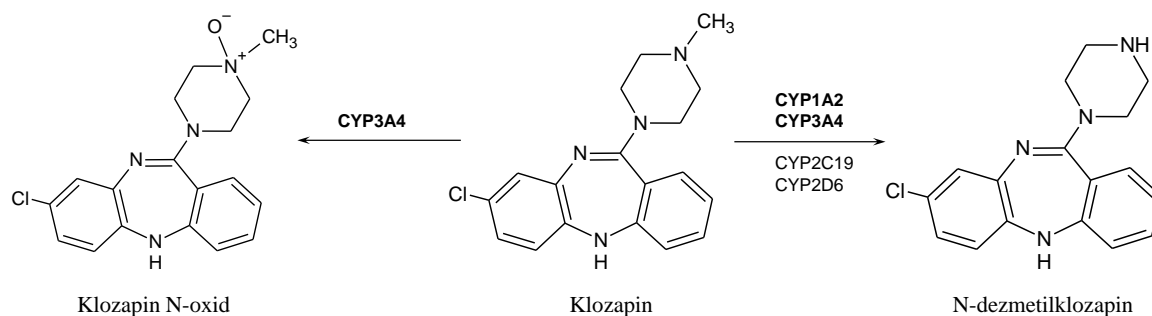
hatásuk mellett igazoltan antidepresszív hatásuk is van, továbbá nem indukálnak fázisváltást. Ezenkívül a kvetiapin, olanzapin és az aripiprazol monoterápiában fázis profilaktikus hatással bír [EMMI 2016].

A továbbiakban két, a vizsgálataink tárgyát képező és a pszichiátriai gyakorlatban gyakran használt második generációs antipszichotikum, a klozapin és az aripiprazol részletes bemutatására kerül sor.

2.6.1 Klozapin

A második generációs antipszichotikumok térnyerése a klozapin megjelenésével kezdődött. A klozapin más hatóanyagokhoz viszonyítva gyengébb D₂ antagonistá, ezzel szemben erős szerotonerg (5-HT_{2A}), kolinerg és adrenerg affinitása hozzájárulhat hatásosságához [Wenthur és Lindsley 2013]. Egyedülálló hatásmechanizmusa miatt egyéb antipszichotikum kezelésre rezisztens betegek (a szkizofrének kb. egyharmada) esetén rendszerint klozapin terápiát alkalmaznak [Lerner *et al.* 2004]. Hatékony mind a szkizofrénia pozitív és negatív tüneteivel szemben, ellenben ritkán okoz EPS-t és tardív diszkinéziát. Előnyei ellenére a klozapin használata korlátozott, köszönhetően annak, hogy alkalmazása esetén fennáll az agranulocitózis kialakulásának kockázata, mely bár ritkán fordul elő, életveszélyes fertőzésekhez vezethet [Nielsen *et al.* 2009]. A klozapinnak ezenkívül gyakori mellékhatása a súlygyarapodás, ami könnyen metabolikus szindrómához vezethet, valamint a szív- és érrendszeri ártalmak [Henderson *et al.* 2000]. Ritkábban előforduló mellékhatásai az epilepsziás rohamok, szívizomgyulladás, tachykardia, hasnyálmirigy-gyulladás [Iqbal *et al.* 2003].

A klozapin biohasznosulása a nagymértékű 'first-pass' metabolizmus következtében mindössze 50-60%. A májban a CYP enzimek intenzíven metabolizálják N-demetiláció, N-oxidáció és hidroxiláció útján. Konjugációs reakciókban jellemzően glükuronidált és szulfatált származékok képződnek [Schaber *et al.* 2001]. Fő metabolitjai a CYP3A4 enzim katalizálta reakcióban képződő, inaktív klozapin N-oxid, valamint az elsődlegesen a CYP3A4 és CYP1A2, kisebb mértékben a CYP2D6 és CYP2C19 enzimek által képződő aktív N-dezmetil-klozapin, más néven norklozapin (5. ábra) [Wenthur és Lindsley 2013].



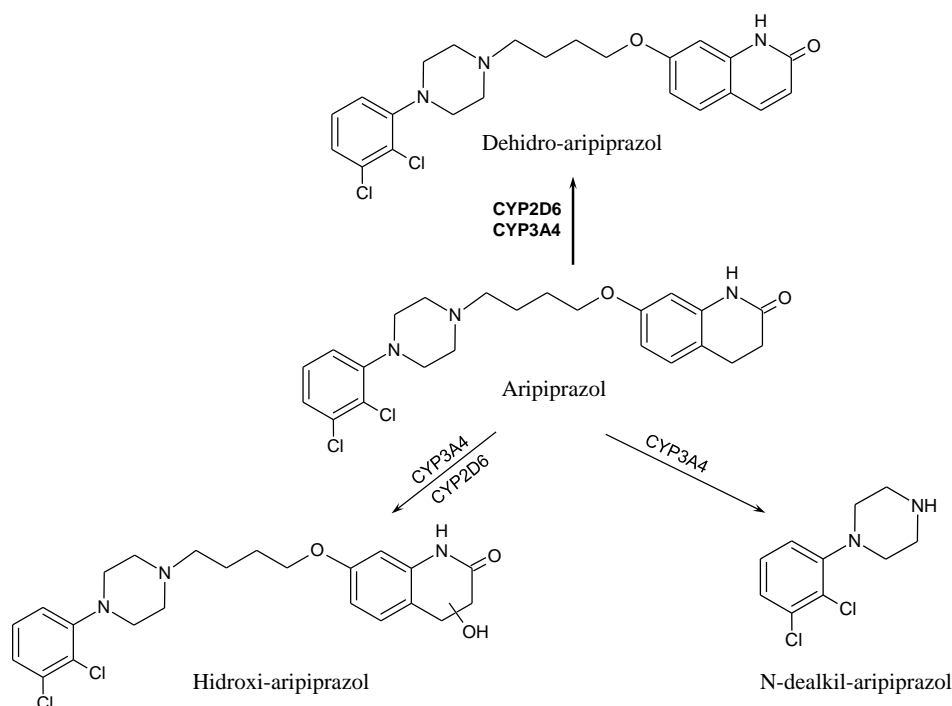
5. ábra. A klozapin fő metabolikus útvonalai

A norklozapin receptor-affinitása kissé eltér az anyavegyületétől (D_2 parciális agonista), és hozzájárulhat a klozapin összetett farmakológiai hatásához [Lameh *et al.* 2007]. Bár a CYP1A2 és CYP3A4 szerepe a klozapin farmakokinetikájában egyértelmű és jól dokumentált, a jelentős genetikai polimorfizmussal rendelkező CYP2C19 és CYP2D6 enzimekkel kapcsolatos vizsgálatok megállapításai ellentmondásosak [Ghassabian *et al.* 2010; Jaquenoud Sirot *et al.* 2009; Lee *et al.* 2012].

2.6.2 Aripiprazol

Az aripiprazol más antipszichotikumokkal ellentétben nem D_2 receptor antagonistaként, hanem parciális agonistaként viselkedik, ami azt jelenti, hogy maximális receptor okkupancia esetén a lehetséges biológiai válasz csak tört részét képes létrehozni. Ennek megfelelően az aripiprazol a dopaminerg rendszer stabilizátoraként fogható fel, mely során a nagy receptor tartaléknak köszönhetően a dopaminerg neuronok autoreceptorain parciális agonista, míg posztzinaptikusan az alacsony receptorszám mellett antagonistát hatást fejt ki. Ezenkívül az aripiprazol a 5-HT_{2A} receptoron antagonistát, a 5-HT_{1A} receptoron parciális agonista hatással bír. Egyedülálló receptorkötési tulajdonságainak köszönhető jó terápiás hatékonysága és kedvező mellékhatás profilja. Hatékony a szkizofrénia pozitív és negatív tüneteivel szemben, mindemellett javítja a kognitív funkciókat [Kerpel-Fronius és Lóránt 2004]. Ritkán előforduló mellékhatásai között említhetjük az EPS-t, testsúly-növekedést, szív- és érrendszeri eseményeket, a prolaktin, koleszterin és glükóz szint emelkedést. Gyakrabban fellépő mellékhatásai az álmatlanság, hányinger, szétszórtság és az akathisia [Tuplin és Holahan 2017]. Az aripiprazol felszívódása a béltraktusból gyors, biohasznosulása orális adagolás esetén 87% [Otsuka Pharmaceutical Co. 2014; Mallikaarjun *et al.* 2004]. Humán máj mikroszómán és rekombináns CYP enzimeken végzett *in vitro* vizsgálatok alapján az aripiprazolból elsődlegesen a CYP2D6 és a CYP3A4 által katalizált reakciókban dehidrogénezett és

hidroxilezett származékok képződnek, míg kizárólag CYP3A4 katalizált reakció során N-dealkilezés történik. A Fázis 2 reakcióknak a metabolizmus szempontjából nincs jelentőségük. A legnagyobb mennyiségben képződő metabolit (6. ábra), a dehidro-aripiprazol receptor-affinitása az aripiprazollal megegyező. Tekintve, hogy a dehidro-aripiprazol steady-state koncentrációja hozzávetőleg 40%-át teszi ki az anyavegyület plazma koncentrációjának, valószínűsíthető, hogy az aktív metabolit hozzájárul az aripiprazol hosszútávú farmakológiai hatásához [Kirschbaum *et al.* 2008; Casey és Canal 2017].



6. ábra. Az aripiprazol fő metabolikus útvonalai

Az aripiprazol metabolizmusát befolyásoló tényezőknek egyértelmű klinikai relevanciája van, így a *CYP2D6* genetikai polimorfizmusnak és a párhuzamosan alkalmazott *CYP2D6* vagy *CYP3A4* gátló vegyületeknek a terápiára gyakorolt hatása jelenleg is intenzíven kutatott terület. Jelenlegi ajánlások alapján a *CYP2D6* gyenge metabolizálók (működésképtelen allélokot homozigóta formában hordozók), illetve erős *CYP2D6* (pl. kinidin, fluoxetin, paroxetin) vagy *CYP3A4* (pl. itrakonazol, klaritromicin) gátló vegyület párhuzamos alkalmazása esetén csökkentett dózis, míg *CYP3A4* induktor vegyület (pl. karbamazepin, rifampicin) párhuzamos terápiája esetén emelt aripiprazol dózis alkalmazandó [Otsuka Pharmaceutical Co. 2014].

3 CÉLKITŰZÉSEK

A farmakogenetika az egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség felderítésének oly módja, melynek során a gyógyszer-lebontásban részt vevő enzimek genetikai analizisével kapott információk alapján állítható be az egyéni gyógyszeres terápia. Ehhez azonban pontosan ismernünk kell, hogy egy adott gyógyszer-metabolizáló enzim kifejeződését milyen mértékben határozza meg annak genetikai háttere, illetve milyen egyéb, nem-genetikai tényező hatását kell szükségszerűen figyelembe vennünk az egyén fenotípusának becslésekor. Munkánk során két, jelentős genetikai polimorfizmussal rendelkező CYP enzim, a *CYP2C19* és a *CYP2D6* genotípus-fenotípus összefüggéseit vizsgáltuk *in vitro* humán máj mikroszóma frakció felhasználásával.

- 1.1 Célunk volt annak feltárása, hogy a *CYP2C19* és a *CYP2D6* genotípus milyen mértékben határozza meg a *CYP2C19* és *CYP2D6* enzimek aktivitását, azaz a fenotípust. A *CYP2C19* és a *CYP2D6* genotípus-alapú fenotípus becslés hatékonyságának összehasonlítása rávilágíthat a két gén transzkripciójának szabályozásában fellelhető eltérések jelentőségére, hiszen míg a *CYP2C19* indukcióját több nukleáris faktor (pl. CAR/PXR, GR) mediálhatja, addig a *CYP2D6* jelen ismereteink szerint konstitutívan expresszálódik.
- 1.2 A szervdonorok anamnézisének áttekintésével kerestük azokat a nem-genetikai tényezőket, amelyek szerepet játszhatnak a genotípus-fenotípus becslés ellentmondásaiért.

In vitro nyert tapasztalatainkat *in vivo* körülmények között teszteltük antipszichotikummal kezelt pszichiátriai betegek gyógyszer-metabolizáló képességének meghatározásával.

2. Kerestük a választ arra, hogy a *CYP2C19**17 allélvariáns a betegeknél együtt jár-e fokozott *CYP2C19* génexpresszióval.
3. Választ kerestünk arra, hogy klozapinnal kezelt pszichiátriai betegek *CYP2C19* genotípusa és expressziója milyen szerepet játszik a klozapin metabolizmusában, illetve a klozapin vérszint kialakulásában.
4. Összefüggést kerestünk aripirazollal kezelt betegek *CYP2D6*, *CYP3A4* és *CYP3A5* genotípusa, *CYP3A4* expressziója, valamint az aripirazol és a fő metabolit dehidro-aripirazol szérumban koncentrációi között.
5. Végül megvizsgáltuk, hogy az aripirazol mellett gyakran alkalmazott, potenciális *CYP2D6* inhibitorok párhuzamos terápiája befolyásolja-e az aripirazol metabolizmusát.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Felhasznált vegyszerek

Az *in vitro* enzimaktivitás és gátlásvizsgálatok során felhasznált dextrometorfán, mefenitoin, risperidon, metoprolol és propranolol a Sigma-Aldrich (Darmstadt, Németország), a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz és a glükóz-6-foszfát a Merck (Darmstadt, Németország) termékei voltak. Az aripiprazol a Toronto Research Chemicals-től (North York, Kanada), a 4'-hidroximefenitoin az Salford Ultrafine Chemicals-től (Manchester, UK), a paliperidon és a dehidroaripiprazol a Santa Cruz Biotechnology-től (Dallas, TX) származott. Az összes többi vegyszer a Merck-től, illetve a Reanal-től (Budapest) kerültek beszerzésre.

4.2 *In vitro* genotípus-alapú fenotípus becslés vizsgálatok

4.2.1 Humán májszövet minták

Az *in vitro* specifikus enzimaktivitás vizsgálatokba 128 (dextrometorfán O-demetilézés), illetve 114 (mefenitoin 4'-hidroxilezés) szervdonortól származó humán májszövet mintát vontunk be, melyeket a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinika biztosított. A donor máj nem, vagy csak egy része került beültetésre. A májszövet mintákat hemodinamikailag stabil, normális májfunkciós paraméterekkel rendelkező agyhalott donorokból távolították el. A minták szállítása hűtve történt. Az MTA Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Laboratóriuma rendelkezik a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével humán májszövet tudományos célból történő felhasználásához. A szervdonorok demográfiai adatait és anamnéziséjét a 7. táblázat foglalja össze.

4.2.2 Mikroszóma preparálás menete

A specifikus CYP enzimaktivitás meghatározáshoz humán májszövetből preparált mikroszóma frakciót használtunk. Kb. 20 g humán májszövetet 154 mM KCl-ot és 1 mM EDTA-t (etiléndiamin-tetraecetsavat) tartalmazó, 0,1 M Tris-HCl (pH=7,4) pufferben homogenizáltunk, majd a homogenizátumot 4°C-on 30 percig 10.000xg-vel centrifugáltuk. A kapott felülúszóból (S9 frakció) ultracentrifugálással (4°C, 60 perc, 105.000xg) ülepíthető ki a mikroszóma frakció [van der Hoeven és Coon 1974]. Centrifugálást követően a mikroszóma frakció ismételt mosása, majd ultracentrifugálás (4°C, 60 perc, 105.000xg) következett. Végül a kiülepített mikroszómát pufferben (0,1 M Tris-HCl, 154 mM KCl, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk és

7. táblázat. Magyarországi szervdonorok demográfiai adatai és anamnézise

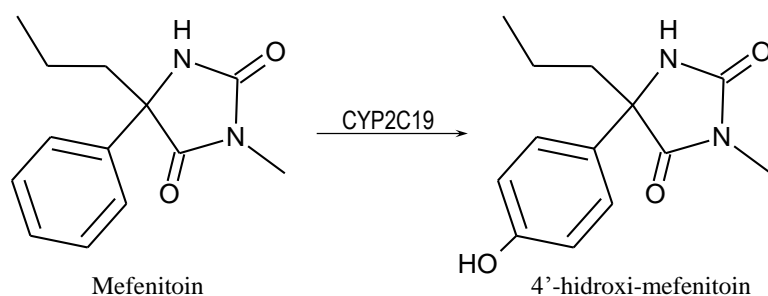
Demográfiai adatok		<i>Mefenitoin 4'-hidroxiláz</i>	<i>Dextrometorfán O-demetiláz</i>
Donorok száma		114	128
Kor (év)	medián (min; max)	45 (13; 74)	45 (13; 74)
Nem	férfi/nő	60/52 [#]	67/61
Halál oka			
	Koonyaári vérzés/ hematoma	61	62
	Subarachnoidális vérzés	30	42
	Subdurális vérzés	5	5
	Epidurális hematoma	1	1
	Intraventriculáris vérzés	5	5
	Agyi aneurizma ruptura	2	4
	Nem ismert	18	5
	Stroke	7	7
	Ischémiás stroke	6	6
	Vérzéses stroke	1	1
	Tumor	11	16
	Baleset	28	30
	Autó/motor/kerékpár baleset	5	12
	Roham okozta fejsérülés	1	1
	Öngyilkosság	4	4
	Fulladás	1	1
	Ismeretlen eredetű fejsérülés	17	12
	Nem ismert	7	13
Anamnézis			
	Rendszeres alkohol- fogyasztás	7	11
	CYP2C19/CYP2D6 szubsztrát/inhibitor terápia [*]	1	4
	Potenciális májkárosító gyógyszer terápia ^{**}	9	2
	Krónikus megbetegedés ^{***}	7	0

[#]két májszövet donor nemével kapcsolatban nem volt információnk; ^{*}CYP2C19 szubsztrát: ranitidin; CYP2C19 inhibitor: karbamazepin; CYP2D6 szubsztrát: haloperidol; CYP2D6 szubsztrát/inhibitor: metoprolol; ^{**}amoxicillin/klavulánsav; ^{***}epilepszia, rheumatoid arthritis, gasztrointesztinális perforáció

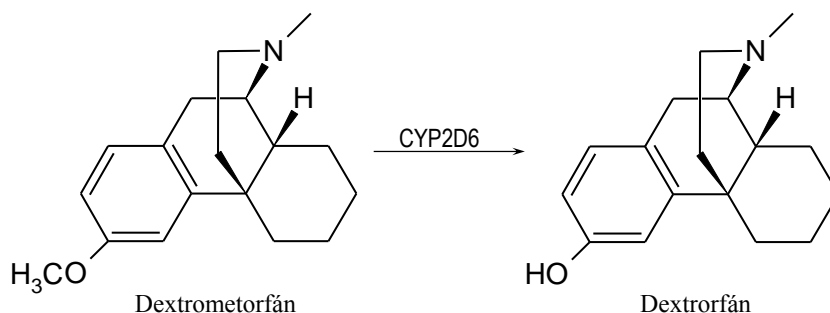
felhasználásig -80°C-on tároltuk. A máj mikroszóma frakció teljes fehérje tartalmát a Lowry és mtsai [Lowry *et al.* 1951] által leírt módszerrel határoztuk meg.

4.2.3 Specifikus CYP enzimaktivitás meghatározása

A CYP enzimaktivásokat a CYP2C19-specifikus mefenitoin 4'-hidroxiláz [Srivastava *et al.* 1991], illetve a CYP2D6-specifikus dextrometorfán O-demetiláz [Kronbach *et al.* 1987] reakciók segítségével határoztuk meg (7. és 8. ábra). Az inkubációs elegy tartalmazta a NADPH-regeneráló rendszert (1 mM NADPH, 5 mM MgCl₂, 10 mM glükóz-6-foszfát, 2 egység/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz), a humán máj mikroszómát és az adott átalakítandó szubsztrátot (8. táblázat). A megfelelő reakciókörülményeket 0,1 M Tris-HCl (pH=7,4) puffer biztosította. Az inkubálás 37 °C-on, molekuláris oxigén jelenlétében történt.



7. ábra. A CYP2C19 által katalizált mefenitoin 4'-hidroxiláz reakció



8. ábra. A CYP2D6 által katalizált dextrometorfán O-demetiláz reakció

8. táblázat. A specifikus CYP enzimaktivitás mérések reakciókörülményei

CYP enzim	Szelektív szubsztrát	Szubsztrát-koncentráció	Mikroszóma (fehérje-tartalom)	Inkubálási idő
CYP2C19	(S)-mefenitoin	1 mM	1,0 mg/ml	20 perc
CYP2D6	dextrometorfán	2 mM	1,6 mg/ml	20 perc

A reakciót jéghideg metanol hozzáadásával állítottuk le, majd centrifugálás (10 perc, 4 °C, 10.000xg) után a felülúszót analizáltuk. A képződött 4'-hidroxi-mefenitoin mennyiségét LC-MS/MS módszerrel, egy Perkin Elmer Series 200 micro LC (Waltham, MA) folyadékromatográfhoz kapcsolt AB Sciex 3200 QTRAP (Framingham, MA) tömegspektrométerrel határoztuk meg, míg a dextrorfán mennyiségi meghatározásához egy LaChrom ELITE (Merck) HPLC-UV kromatográfias rendszert használtunk (9. táblázat). A specifikus CYP enzimaktivitás értékeket kalibrációs sorok segítségével molárisan, fehérje-tartalomra (mg) és inkubációs időre (perc) vonatkoztatva adtuk meg. A tömegspektrometriás méréseket Dr. Szabó Pál (MTA Természettudományi Kutatóközpont, Budapest) végezte.

9. táblázat. Alkalmazott analitikai módszerek

Katalizált reakció	Állófázis	Eluens összetétele	Detektálási hullámhossz	MS mód	MRM átmenetek (m/z)
CYP2C19: mefenitoin 4'- hidroxiláció	Purospher STAR RP-18 endcapped 55x2mm (3µm)	acetonitril:10 mM ammónium-acetát (gradiens)	-	pozitív ESI MS-MS (MRM)	mefenitoin: 219/134 (23 eV) 4'-OH mefenitoin: 235/150 (25 eV) fenacetin (IS): 180/110 (25 eV)
CYP2D6: dextrometorfán O-demetilezés	Lichrospher 100 RP-18 125x4mm (5µm)	acetonitril:150 mM nátrium perklorát (pH=2,0)=3:7 (v/v)	200 nm	-	-

ESI: elektropray ionizáció; IS: belső standard; MRM: multiple reaction monitoring

4.2.4 Genomiális DNS izolálás

A humán májszövetből a genomiális DNS kivonását Quick-DNA Universal Kit-tel (Zymo Research, Irvine, CA) végeztük. Az izolálás során a gyártó által megadott, szövetre vonatkozó protokollt alkalmaztuk. Az izolált DNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) ellenőriztük, és felhasználásig - 20 °C-on tároltuk.

4.2.5 RNS izolálás

A donorok májszövetét (~10 mg) homogenizáltuk, majd 1 ml TRI reagensben (MRC, Cincinnati, OH) lizáltuk. Az RNS izolálást a gyártó által megadottak szerint végeztük. Az RNS-t 0,01% DEPC-el (dietyl-pirokarbonát) kezelt vízben oldottuk. Az RNS koncentrációjának meghatározását és tisztaságának ellenőrzését szintén NanoDrop 1000 spektrofotométerrel végeztük el.

4.2.6 Reverz transzkripció

Az izolált totál RNS reverz transzkripcióját a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a gyártó által megadott utasítások szerint. Az átírás templátjául 5 µg RNS szolgált. A reverz transzkripció a következő hőmérsékleti protokoll mellett zajlott: 10 perc 25 °C-on, 30 perc 50 °C-on végül 5 perc 85 °C-on.

4.2.7 Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR méréseinket az amplifikálni kívánt DNS szakaszt közrefogó primer párral és TaqMan próbákkal végeztük. A reakciókhoz alkalmazott, kereskedelmi forgalomban elérhető „MasterMix” tartalmazta a dNTP-eket (dezoxiribonukleozid-trifoszfát), a Taq DNS polimerázt, valamint az optimális körülményeket biztosító puffert. A TaqMan próba egy mindkét végén fluoreszcensen jelölt oligonukleotid, amely a fluoreszcens rezonancia-energiaátadás (FRET) jelensége révén képes biztosítani a detektálhatóságot. A TaqMan próba 5' végére szintetizált riporter fluorofór energiáját a próba 3' végén található quencher (kioltó) molekula a kis távolságnak köszönhetően elnyeli. A lánchosszabbítás során azonban a DNS polimeráz 5'-3' irányú exonukleáz aktivitása nukleotidokra bontja a próbát, a riporter és a quencher molekulák közötti távolság megnő, ezzel megszűnik a quencher kioltó szerepe, így a gerjesztett riporter molekula által emittált fény detektálhatóvá válik. A detektált fluoreszcens jel intenzitása arányos a specifikus célszekvencia aktuális mennyiségével. Az SNP (single nucleotide polymorphism – egy bázist érintő polimorfizmusok) kimutatáshoz és a mRNS szint mérésekhez használt primereket és próbákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázis és a Primer Designing Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) szoftver segítségével terveztük, továbbá az IDT (Integrated DNA Technologies) OligoAnalyzerTool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) segítségével analizáltuk. A felhasznált oligonukleotidokat a BioSearch Technologies (Novato, CA) szintetizálta. A reakciókat CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) készülékeken futtattuk.

4.2.8 CYP allélvariánssokra jellemző SNP-k kimutatása

A kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló allélvariánssokra jellemző SNP-k kimutatását RT-PCR (real-time PCR) technikával végeztük. Az SNP kimutatásához egy reakcióelegyben két különböző hullámhosszon emittáló fluoreszcens festékkel jelölt TaqMan próbát alkalmazunk, melyek kizárólag a vizsgálandó bázisban különböznek egymástól pontosan az adott SNP pozíciójában. Ennek köszönhetően a PCR végén mért fluoreszcens jelek

relatív intenzitása alapján elkülöníthetők a homozigóta vad, homozigóta mutáns és heterozigóta genotípusú minták (alléldiszkrimináció). A fenti technikát alkalmaztuk mind az egy bázis cserével (*CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*4*, *CYP2C19*17*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*, *CYP3A5*3*), mind az egy bázis kieséssel (*CYP2D6*3*, *CYP2D6*6*) járó polimorfizmusok, valamint a *CYP2D6* szabályzó szakaszán található -1584C>G SNP kimutatására. A felhasznált primerek és próbák szekvenciáit, az alkalmazott végkoncentrációkat és az annealing hőmérsékletét a Függelék 23. táblázata tartalmazza. A reakciókhoz Luminaris Probe qPCR Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk, a gyártó által megadott hőmérséklet-protokoll szerint (Függelék 24. táblázat). A termékek méretét agaróz gélelektroforézissel, specifikusságát szekvenálással (Macrogen Europe, Amsterdam, Hollandia) ellenőriztük.

4.2.9 *CYP2D6* allél-specifikus kópiaszámának meghatározása

A *CYP2D6* allélvariánsai között található a gén kópiaszámát érintő polimorfizmusok (CNV-k) is, mint a teljes gén deléció, duplikáció, multiplikáció, és ezek értelemszerűen befolyásolják a génexpressziót, ezáltal a *CYP2D6* enzimaktivitást (ld. 2.4.2 fejezet). A *CYP2D6* gén kópiaszámát kvantitatív PCR (qPCR) technika és CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories) készülék segítségével határoztuk meg. A mérésekhez a *CYP2D6* génre kifejlesztett TaqMan Copy Number Assay-t (Assay ID: Hs00010001_cn; Thermo Fisher Scientific) alkalmaztuk. A humán genomban mindig két kópiában megtalálható *RNáz P*-t használtuk referenciaként, melynek meghatározásához a TaqMan Copy Number Reference Assay (Thermo Fisher Scientific) állt rendelkezésünkre. A qPCR adatainak értékelésében a CFX Manager 3.0 szoftver $\Delta\Delta Cq$ módszere (áttörési pontok különbségén alapuló normalizáció) volt segítségünkre.

A kereskedelmi forgalomban kapható TaqMan Copy Number Assay a *CYP2D6* összkópiaszámát határozza meg, és mivel a duplikáció vagy multiplikáció a polimorf allélvariánsokat is érintheti, ezért heterozigóta minták esetén nem állapítható meg egyértelműen, hogy melyik allél van jelen több kópiában. Ennek a problémának a kiküszöbölése érdekében fejlesztettünk egy, a *CYP2D6* leggyakrabban előforduló, működésképtelen gént eredményező *CYP2D6*4* allélvariánsára allél-specifikus kópiaszám-mérésre alkalmas módszert, mely a SNP genotipizáló és a qPCR technikák ötvözésén alapszik. A reakcióhoz alkalmazott oligonukleotidok szekvenciáit a 10. táblázat tartalmazza. A genotipizáláshoz használt, a *CYP2D6*1* illetve *CYP2D6*4* allélokra specifikus TaqMan próbák mellett az *RNáz P* referencia génnel (Thermo Fisher Scientific) egyidejűleg futtatott minta

*CYP2D6*1* és *CYP2D6*4* kópiaszámai külön-külön meghatározásra kerülnek (multiplex mérés). A méréshez Luminaris Probe qPCR Master Mixet (Thermo Fisher Scientific) használtunk. Az alkalmazott primerek és próbák szekvenciáit a 10. táblázat tartalmazza. A PCR ciklusai során a primer kötődésének és a lánchosszabbítás 55 °C-on ment végbe. A mérés megbízhatóságát 0,625-5,0 ng/μl templát DNS tartományban, kalibrációs egyenes illesztéssel ellenőriztük. A kalibrációs egyenesek alapján a *CYP2D6*1* és a *CYP2D6*4* allélra beállított reakciók hatékonysága rendre 98% ($R^2=0,99$) és 97%-nak ($R^2>0,99$) bizonyult.

10. táblázat. Allél-specifikus kópiaszám-meghatározáshoz alkalmazott primer és próba szekvenciák

Primerek		Próbák	
Forward	CTTCGCCAACCCTCC	<i>CYP2D6*1</i>	CalRed610-CCCCAGGACGCCC-BHQ2
Reverse	GATCACGTTGCTCACG	<i>CYP2D6*4</i>	FAM-CCCCAAGACGCCC-BHQ1

4.2.10 CYP2C19 mRNS szint mérése

A májszövetek CYP2C19 mRNS szintjének mérése qPCR technikával történt és relatív mennyiségi meghatározáson alapult. Referenciának a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH-t) mRNS szintjét tekintettük. A GAPDH, mint „háztartási” gén konstitutív expressziója külső hatásokra nem változik. A CYP2C19 mRNS mennyiségeket a mintában mért GAPDH és a CYP2C19 áttörési Cq értékei alapján számítottuk. A két Cq érték különbségét felhasználva megkapható a CYP2C19 mRNS relatív mennyisége a következő összefüggés szerint:

$$\frac{CYP}{GAPDH} = 2^{-\Delta Cq}, \text{ ahol } \Delta Cq = Cq_{CYP} - Cq_{GAPDH}$$

A primer és próba oligonukleotid szekvenciák (Biosearch Technologies) a Függelék 25. táblázatban találhatóak. A qPCR reakcióhoz 2x Kapa Probe Fast qPCR Master Mix-et (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) használtunk, a hőmérsékletprotokoll a gyártó ajánlása szerint zajlott (Függelék 24. táblázat).

4.3 Klinikai vizsgálatok

4.3.1 Humán vérminták

A vizsgálatokba bevont pszichiátriai betegek vérmintáit a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájától kaptuk. A betegek tájékoztatása írásban történt, az esetleges kérdésekre a kezelőorvosoktól kaptak választ. A vizsgálatban való részvételhez írásban járultak

hozzá. Az MTA Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportja rendelkezik a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság szükséges engedélyeivel pszichiátriai betegek vérmintáinak tudományos célból történő felhasználásához. Kizárólag a kaukázusi populációhoz tartozó betegek vettek részt a vizsgálatokban. A CYP vizsgálatokhoz és vérszint meghatározásokhoz szükséges vérvétel minden esetben a reggeli gyógyszer-bevételt megelőzően történt.

11. táblázat. Pszichiátriai betegek demográfiai és gyógyszerelési adatai

	Klozapin	Aripiprazol
Betegek száma	116	93
Nem (férfi/nő)	47/69	41/52
Diagnózis		
Szkizofrénia	100	85
Szkizoaffektív zavar	16	0
Bipoláris affektív betegség	0	8
Kor (év)*	39 (17; 74)	31 (18; 65)
Testtömeg (kg)*	76 (51; 128,5)	80 (47; 145)
Komedikáció		
Nincs	8	15
Aripiprazol	28	-
Klozapin	-	30
Haloperidol	30	8
Kvetiapin	6	12
Risperidon	14	16
Klonazepám	13	20
Valproát	8	11
Lamotrigin	6	3
Propranolol	39	21
Metoprolol	5	15
Metformin	6	10

*Medián (min; max)

Az első vizsgálatba 116, legalább 2 héten keresztül stabil klozapin vérszinttel rendelkező beteget vontunk be. A betegek demográfiai adatait és gyógyszerelését a 11. táblázat foglalja össze. A klozapin terápia alacsony dózissal indult (12,5-25 mg/nap), majd 12,5-50 mg/nap dózisemelésekkel folytatták az optimális gyógyszerválasz eléréséig.

Második vizsgálat-sorozatunkba 93 aripiprazollal kezelt pszichiátriai beteget vontunk be, kizárólag azokat, akiket legalább 4 hétig stabil aripiprazol dózissal kezeltek, ezenkívül 14 napig

a mért vérszintekben nem mutatkozott különbség. A demográfiai és gyógyszerelési adatokat a 11. táblázat tartalmazza. A terápia 7,5 mg/nap kezdő dózissal indult, majd fokozatosan az optimális gyógyszerválasz eléréséig emelve érte el a terápiás 10-30 mg/nap közötti céldózist. A terápia hatékonyságát pszichiáter szakorvos rendszeres állapotfelméréssel, a PANSS (pozitív és negatív tünetek skálája) és a CGI (klinikai összbemérés skála) pontszámok alapján ítélte meg. A mintavételt megelőzően négy héten keresztül követtük az aripiprazol dozírozást.

4.3.2 Vérszint mérések

Az antipszichotikum és metabolit vérszintek meghatározásához a vérvételre a reggeli gyógyszer-bevételt megelőzően, hozzávetőleg 12 órával az utolsó dózist követően került sor. A natív vérmintákat centrifugáltuk (4 °C, 10 perc, 1000xg), majd a felülúszót, azaz a szérumot leszívtuk, és felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A klozapin, aripiprazol és metabolitjaik (klozapin N-oxid, N-dezmetil-klozapin, dehidro-aripiprazol) steady-state koncentrációinak meghatározásához kalibrációs sorokat készítettünk az egyes standard oldatok és kontroll (hatóanyagot nem tartalmazó) szérum felhasználásával. A koncentráció-tartományok a következők voltak: klozapin, 20-1500 ng/ml; klozapin N-oxid, 50-1000 ng/ml; N-dezmetil-klozapin, 20-1000 ng/ml; aripiprazol, 1-1000 ng/ml; dehidro-aripiprazol, 1-500 ng/ml. Belső standardként karbamazepin szolgált, melyet acetonitrilben oldva adtunk hozzá a szérum mintákhoz. A mintákat LC-MS/MS technikával analizáltuk. A méréseket Sirok Dávid (Toxi-Coop Zrt., Budapest) végezte egy Finnigan Surveyor HPLC (Thermo Fisher Scientific) folyadékkromatográf és egy Finnigan TSQ Quantum Ultra MS (Thermo Fisher Scientific) tömegspektrométer segítségével. A kromatográfiás elválasztáshoz egy Inertsil ODS-4 75x2,1 mm (3µm) állófázist (GL Sciences, Tokió, Japán), valamint 0,1% hangyasav és acetonitril mozgófázist alkalmaztunk gradiens elegyösszetétel mellett. A tömegspektrometriás detektálás paramétereit a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat. Vérszint meghatározásokhoz alkalmazott analitikai módszer

	Klozapin	Klozapin N-oxid	N-dezmetil-klozapin	Aripiprazol	Dehidro-aripiprazol
MS mód	pozitív ESI, MS-MS (MRM)				
MRM átmenetek (m/z)	327/270	343/192	313/192	448/176	446/216
	327/192	343/256	313/270	448/285	446/285

ESI: elektropray ionizáció; MRM: multiple reaction monitoring; MS: tömegspektrométer

4.3.3 Fehérvérsejt izolálás

A CYP genotípus és a CYP expressziós vizsgálatainkhoz a pszichiátriai betegek alvadásgátlóval (EDTA) kezelt vérmintáját használtuk fel. 500 µl alvadásgátolt vérhez 1 ml vörösvértest lízis puffert (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH=7,2-7,5) adtunk, majd 10 perces, lassú keverést követően centrifugáltuk (5 perc, 1.000xg). A centrifugálással kiülepített fehérvérsejteket újabb 1 ml lízis pufferrel mostuk, majd ismét centrifugáltuk (5 perc, 1.000xg). A felülúszó eltávolítása után a vörösvértestektől megtisztított fehérvérsejtek kb. egytizedét PBS (foszfát tartalmú sóoldat) pufferben szuszpendáltuk, a fennmaradó részt TRI reagensben (MRC, Cincinneti, USA) lizáltuk, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

4.3.4 A gyógyszer-metabolizáló képesség becslése

A pszichiátriai betegek aktuális CYP2C19, CYP2D6 és CYP3A metabolikus kapacitását a Temesvári és mtsai. által kidolgozott CYPtest diagnosztikai rendszer alapján mértük [Temesvári *et al.* 2012]. A módszer egyrészt magában foglalja a *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* és a *CYP3A5* gének polimorfizmusainak kimutatását, másrészt a fehérvérsejtekben mérhető CYP2C19 és CYP3A4 mRNS szintek meghatározásával becsülhetővé válik ezeknek májban jellemző expressziója és aktuális enzimaktivitása [Temesvári *et al.* 2012]. Ugyanis a CYP2C19 és a CYP3A4 enzimek májban mérhető aktivitása a funkcióvesztő mutációt nem hordozó egyéneknél szoros korrelációt mutat mind a májban, mind a leukocitákban mérhető relatív CYP mRNS szintekkel. Így a fehérvérsejtek CYP mRNS szintjei alapján az egyének alacsony, átlagos és magas expresszáló kategóriákba sorolhatók. A leukocitákban mérhető relatív CYP mRNS szintek 'cut-off' értékeit, melyek az egyes kategóriák közötti határértéket képezik, a 13. táblázat tartalmazza.

13. táblázat. CYP expresszió kategorizálása relatív mRNS szint alapján [Temesvári *et al.* 2012]

	Cut-off érték	
	PE-IE	IE-EE
CYP2C19	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
CYP3A4	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴

PE: alacsony expresszáló; IE: átlagos expresszáló; EE: magas expresszáló

A betegek vérmintáiból történő genomialis DNS izolálásához 100 µl PBS-ben szuszpendált fehérvérsejtet használtunk fel. Az izoláláshoz a Quick-DNA Universal Kit (Zymo Research) gyártó által sejtsuszpenzióra ajánlott protokollját követtük, amely csak a proteináz K enzimmel

történő emésztés időtartamában tér el a szövetekre ajánlott protokolltól (4.2.4 fejezet), azaz míg szövetek esetén 1-3 órás emésztés javasolt, sejtszuszpenziók esetében mindössze 10 perces inkubálás elegendő. Az RNS izolálás a TRI reagensben felvett fehérvérsejtekből a korábban ismertetett módszer szerint (ld. 4.2.5 fejezet), a reverz transzkripció a 4.2.6 fejezetekben leírtak szerint történt. A pszichiátriai betegek mintáinak CYP genotipizálása és a CYP mRNS szintek meghatározása a szervdonorok vizsgálatánál ismertetett módon történt (ld. 4.2.8, 4.2.9 és 4.2.10 fejezet).

A klopapinnal kezelt betegeknél a CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A enzimek szerepét vizsgáltuk, azonban jelen munkában csak a *CYP2C19* genetikai polimorfizmusának hatásaira fókuszáltunk. Ennek megfelelően ebben a betegcsoportban a *CYP2C19* genotípus (*CYP2C19*2*, *CYP2C19*3*, *CYP2C19*4* és *CYP2C19*17*) és a *CYP2C19* mRNS expresszió mérését végeztük el. Az aripiprazol metabolizmusában a CYP2D6 és a CYP3A enzimek szerepét igyekeztünk tisztázni, így a vizsgálatunk a CYP2D6 (*CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*10*, *CYP2D6*41* és génduplikáció/multiplikáció), a CYP3A4 (*CYP3A4*1B* és *CYP3A4*22*) és a CYP3A5 (*CYP3A5*3*) gének polimorf allélvariánsainak kimutatására, illetve a CYP3A4 mRNS szint meghatározására terjedt ki.

4.4 Az aripiprazol metabolizmus gátlásvizsgálata

Az aripiprazol metabolizmusát *in vitro* humán máj mikroszóma frakcióval, potenciális gátlószerek jelenlétében vizsgáltuk. A kísérletekhez három humán szervdonor májszövetéből izolált mikroszóma frakciót használtunk (ld. 4.2.2 fejezet). Az inkubációs elegy tartalmazta a NADPH-regeneráló rendszert (1 mM NADPH, 5 mM MgCl₂, 10 mM glükóz-6-foszfát, 2 egység/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz), a humán máj mikroszómát (1 mg fehérje/ml) és az aripiprazolt. 60 perces inkubálást követően a reakciót jég hideg, karbamazepin belső standard tartalmú acetonitril hozzáadásával állítottuk le. A képződött metabolitok mennyiségét LC-MS/MS technikával analizáltuk. Az aripiprazol és a dehidro-aripiprazol analitika körülményei megegyeztek a 4.3.2 fejezetben leírtakkal. Ezt további két metabolit MRM átmenetének követésével egészítettük ki, melyek az N-dealkil-aripiprazol esetében m/z 231/188 és 231/152, a hidroxil-aripiprazol esetében m/z 464/285 és 464/234 voltak. Vizsgálataink tárgyát az antipszichotikum terápia mellett gyakran alkalmazott, a CYP2D6-ot gátló hatóanyagok aripiprazol metabolizmusára kifejtett hatása képezte, ezért az aripiprazol metabolitjainak képződését risperidon, 9-hidroxi-risperidon, metoprolol és propranolol jelenlétében is mértük. A potenciális gátlószerek K_i értékeinek meghatározásához különböző aripiprazol (10, 25 és 50

μM) és gátlószer (0, 1, 5, 10, 25 és 50 μM) koncentrációk kombinációját alkalmaztuk. Dixon ábrázolás (a reakciósebesség reciproka ábrázolva az inhibitor koncentráció függvényében) segítségével, a három egyenes metszéspontja alapján állapítottuk meg a gátlás típusát és határoztuk meg a látszólagos K_i állandót, melyet átlag \pm SD (standard deviance) értéként adtuk meg.

4.5 Statisztikai értékelés

A specifikus CYP enzimaktivitásokat minden egyes szervdonor májszövetéből izolált mikroszómában meghatároztuk, és az értékek gyakorisági eloszlását Kolmogorov-Szmirnov-próbával (OriginPro 2018, OriginLab Co., Northampton, MA) vizsgáltuk, mely a CYP2C19 és a CYP2D6 esetében is aszimmetrikus eloszlást mutatott. A mért aktivitások alapján négy fenotípus kategóriát különítettünk el 95%-os megbízhatósági intervallum mellett: a legalacsonyabb aktivitást mutató 10-15% a gyenge (poor metabolizers - PM), a legmagasabb 10-15%-kal rendelkezők az ultra-gyors metabolizálók (ultra-rapid metabolizers – UM) csoportját alkották, míg a középső halmazba tartozó intermedier (intermediate metabolizers – IM) és extenzív metabolizálók (extensive metabolizers - EM) közötti 'cut-off' értéket az aktivitások medián értéke jelentette.

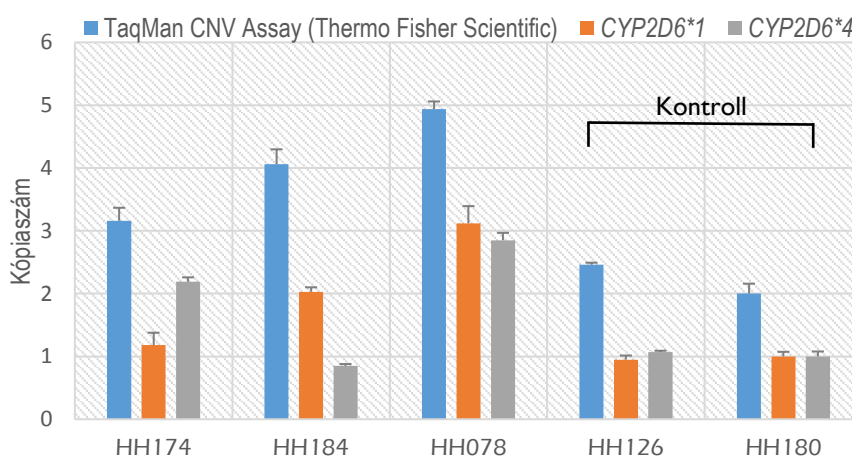
A szervdonorok genotípusa alapján szintén négy kategóriába soroltuk a mintákat: két működésképtelen (*CYP2C19**2, *3, *4, illetve *CYP2D6**3, *4, *5, *6) vagy egy működésképtelen és egy csökkent aktivitással járó allélvariánst (*CYP2D6**10, *41) hordozókat gyenge, két működőképes, vad allélt hordozókat extenzív metabolizáló kategóriába soroltuk, míg egy vad allél mellett működésképtelen vagy csökkent aktivitású allélvariánssal rendelkezőket intermedier metabolizálóknak tekintettük. A genotípus alapján CYP2D6 ultra-gyors metabolizáló kategóriát képviselték a kettőnél több vad allélt hordozók (génduplikáció/multiplikáció jelenléte). A *CYP2C19**1/*17 és a *CYP2C19**17/*17 diplotípusokat CYP2C19 ultra-gyors metabolizáló kategóriába soroltuk. Mivel a *CYP2C19**17 allélvariáns mellett CYP2C19 működésképtelen allélt hordozók besorolása ellentmondásos, így ez esetben elfogadhatónak tekintettük intermedier és extenzív metabolizálókként való besorolásukat is. A különböző CYP2C19 diplotípussal rendelkező csoportok enzimaktivitás és mRNA expressziós eredményeinek összehasonlításához Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk. A dózis/testtömeggel normalizált aripiprazol és klozapin koncentrációkat és a metabolit/anyavegyület arányokat medián (min; max) és átlag \pm SD értékekben fejeztük ki. Az aripiprazollal kezelt pszichiátriai betegek mintáinak elemzése során a CYP3A4 expresszió, a

CYP2D6 és a *CYP3A5* genotípus mint változók aripiprazol vérszintre gyakorolt hatását főkomponens-analízissel és részleges legkisebb négyzetek (PLS – partial least-squares regression) módszerével vizsgáltuk (SIMCA, MKS Umetrics AB, Umea, Svédország), a modellezést Ales Belic (University of Ljubljana, Ljubljana, Szlovénia) munkája segítette. A főkomponenseket az eredeti változók lineáris kombinációi adták, és aszerint lettek rendezve, hogy az eredeti adathalmazban megmutatkozó különbségekhez milyen mértékben járultak hozzá. A módszer a főkomponens-analízissel kiküszöböli a változók közötti korrelációkat, majd iteratív eljárással kiszámítja az optimális lineáris modellt. A modell együttthatóinak vizsgálatával megkapjuk azokat az eredeti változókat, melyek szignifikáns információval bírnak a függő változó predikciójában. A mért pontokra illesztett predikciós egyenes a modell pontosságát mutatja, azaz a pontok egyeneshez viszonyított elhelyezkedéséből következtethetünk arra, hogy az adatok variabilitását milyen mértékben tükrözi a modell. Az aripiprazol vérszintek és a dehidro-aripiprazol/aripiprazol arány *CYP2D6* diplotípus csoportok közötti különbségeinek vizsgálata Kruskal-Wallis variancia-analízissel és Dunn-teszttel történt. A *CYP2D6* gátlószerek vérszintre gyakorolt hatásának vizsgálatához a magas aripiprazol vérszintek (>300 ng/ml) gyakoriságát Fisher-féle egzakt teszt segítségével vetettük össze a *CYP2D6* vad allélt hordozó betegeknél, ahol $P < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A normalizált klozapin vérszintek *CYP2C19* diplotípus csoportok közötti különbségeinek értékeléséhez szintén Kruskal-Wallis variancia-analízist és az ezt követő Dunn-tesztet alkalmaztuk. A statisztikai próbákat GRAPHPAD INSTAT (v3.05; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) szoftver segítségével végeztük el.

5 EREDMÉNYEK

5.1 *CYP2D6* allél-specifikus kópiaszám mérése

A *CYP2D6* genetikai polimorfizmusai között gyakran előfordul a gén kópiaszámának megváltozása, mint a teljes géndeléción, és a duplikáció/multiplikáció, melyek meghatározóak az adott egyén fenotípusára nézve. Kutatócsoportunkban korábban a *CYP2D6* kópiaszámának mérésére egy kereskedelmi forgalomban kapható *CYP2D6* CNV assay-t használtunk (TaqMan Copy Number Assay, Thermo Fisher Scientific), ami azonban kizárólag az össz-kópiaszámot képes mérni, így működésképtelen allélvariánst hordozó heterozigóta, *CYP2D6* duplikációt hordozó egyének genotípusát nem képes egyértelműen meghatározni, nem képes elkülöníteni a vad típusú allél, illetve a funkció-vesztő mutációt hordozó allél kópiaszám eltéréseit. Ezért allél-specifikus módszert dolgoztunk ki kópiaszám meghatározásához, amely az SNP genotipizáló és a qPCR módszereket ötvöző technikával a leggyakrabban előforduló működésképtelen allélvariánst, a *CYP2D6*4* kópiaszámát specifikusan megkülönbözteti a vad-típusú *CYP2D6*1* kópiaszámától, ezáltal a genotípus-alapú fenotípus becslés pontosítható. A 9. ábrán *CYP2D6*1*/**4* diplotípussal rendelkező, génduplikációt hordozó és kontroll minták *CYP2D6* kópiaszám-mérés eredménye került bemutatásra, összehasonlítva a kereskedelmi forgalomban megvásárolható CNV assay-vel kapott eredményekkel. A módszer helyességét 'droplet' digitális PCR (droplet digital PCR System, Bio-Rad) segítségével igazoltuk.



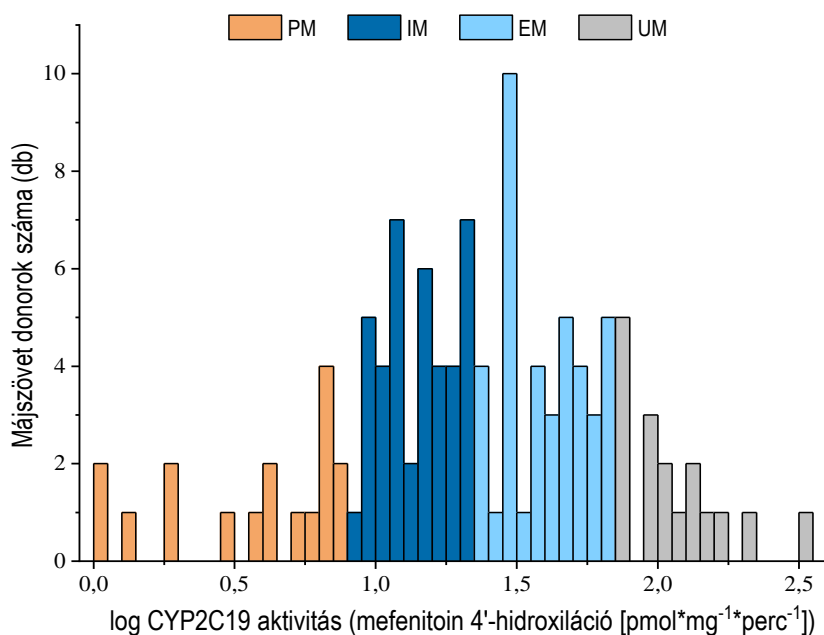
9. ábra. A *CYP2D6*1* és *CYP2D6*4* allélspecifikus kópiaszám-meghatározása összevetve a kereskedelmi forgalomban kapható CNV assay eredményével

5.2 CYP *in vitro* enzimaktivitás és a genotípus kapcsolata

Munkánk során a két legnagyobb genetikai polimorfizmussal rendelkező CYP enzim, a CYP2C19 és a CYP2D6 genotípus-fenotípus kapcsolatát vizsgáltuk. Jelenlegi ismereteink szerint a CYP2D6 expressziója külső hatásokra nem változik meg, így az aktivitásában mutatkozó egyéni eltérések elsődlegesen a genetikai polimorfizmusára vezethetők vissza. Ezzel szemben a CYP2C19 expresszióját a genetikai polimorfizmus mellett a szabályozó régióban megtalálható nukleáris receptor kötő szakaszoknak köszönhetően külső hatások jelentősen befolyásolhatják. A két gén genotípus-fenotípus kapcsolatainak összehasonlításával képet kaphatunk arról, hogy az eltérő reguláció, ezáltal a nem-genetikai tényezők hatása milyen mértékben csökkenthetik a genotípus-alapú fenotípus becslés alkalmazhatóságát.

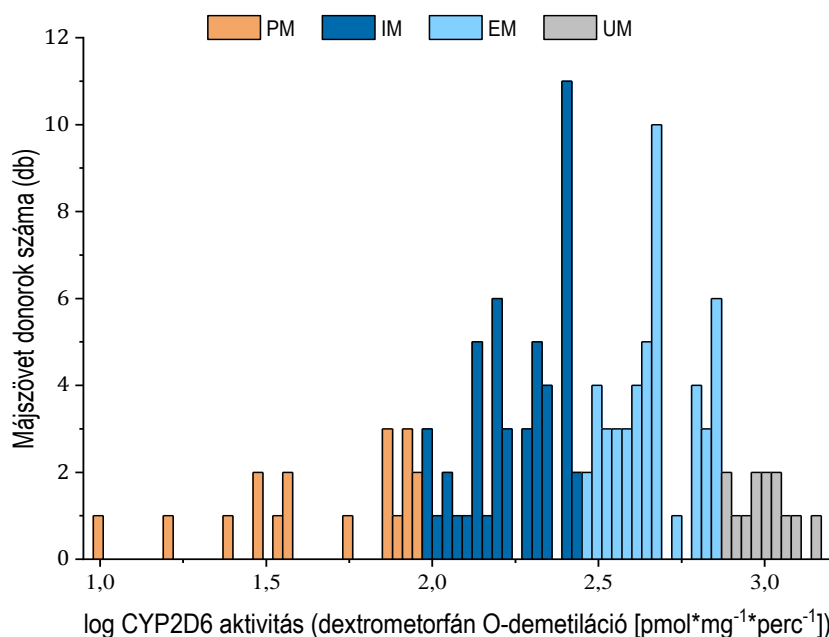
5.2.1 CYP2C19 és CYP2D6 enzimaktivitás egyéni eltérései

A CYP2C19 specifikus aktivitást a mefenitoin 4'-hidroxiláz reakció sebességével jellemeztük 114 szervdonorból származó humán máj mikroszóma frakció felhasználásával. A mefenitoin CYP2C19 katalizálta átalakulásával képződő 4'-hidroxi-mefenitoin mennyiségét a mikroszóma fehérjetartalmára és időegységre vonatkoztatva adtuk meg. Az aktivitásokat jelentős egyéni eltérések és aszimmetrikus eloszlás jellemezte (10. ábra). Míg két donor esetén metabolitképződés nem volt kimutatható, addig néhány esetben a medián értéknél ($23 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$) lényegesen magasabb ($>200 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$) CYP2C19 aktivitást tapasztaltunk. A donorok anamnézisében a májfunkciót befolyásoló tényezőkre tekintettel 7 egyénnél tüntettek fel krónikus alkoholfogyasztást és 9 esetben amoxicillin/klavulánsav terápiát. Egy donor CYP2C19 szubsztrát és inhibitor (ranitidin és karbamazepin) hatóanyagok kezelése alatt állt. Különböző krónikus gyulladási folyamatokkal járó kórkép, mint pl. rheumatoid arthritis vagy gastrointesztinális perforáció, illetve - szintén gyulladási faktorok felszabadulásával járó - epilepsziás roham miatt bekövetkező haláleset összesen 7 esetben szerepelt az anamnézisben.



10. ábra. Humán májszövet minták (N=114) CYP2C19-szelektív mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitásának gyakorisági eloszlása. PM: gyenge metabolizáló; IM: intermediér metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló

A CYP2D6 specifikus aktivitás meghatározásához dextrometorfánt alkalmaztunk próbaszubsztrátként 128 szervdonor májszövetét felhasználva. A reakció során a dextrometorfán *O*-demetilézésével képződő dextrorfán fehérjetartalommal és időegységgel normalizált mennyiségével jellemeztük a CYP2D6 enzimaktivitást, melynek gyakorisági eloszlása szintén aszimmetrikusnak bizonyult (11. ábra). Az aktivitás értékek rendkívül széles tartományban változtak a vizsgált populációban, akár három nagyságrendes eltérést produkálva. Aspecifikus májkárosító tényezők között 11 esetben krónikus alkoholfogyasztás, kettő esetben amoxicillin/klavulánsav terápia szerepelt az anamnézisben, míg négy egyénnél CYP2D6 inhibitor/szubsztrát terápia állt fenn (ld. 7. táblázat).



11. ábra. Humán májszövet minták (N=128) CYP2D6-szelektív dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitásának gyakorisági eloszlása. PM: gyenge metabolizáló; IM: intermediér metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló

14. táblázat. A májszövet donorok CYP2C19 és CYP2D6 enzimaktivitás értékei

CYP enzim	N	Specifikus enzimaktivitás (pmol*mg ⁻¹ *perc ⁻¹) Medián (min; max)	Cut-off érték		
			PM-IM	IM-EM	EM-UM
CYP2C19: mefenitoin 4'-hidroxiláz	114	23 (0; 343)	8	23	75
CYP2D6: dextrometorfán <i>O</i> -demetiláz	128	290 (0; 1461)	95-100	290	720

PM: gyenge metabolizáló; IM: intermediér metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló

A fenotípus kategóriák közötti 'cut-off' értékeket a 14. táblázat tartalmazza. A demográfiai paraméterek, mint a donorok kora vagy neme, nem befolyásolta a CYP aktivitásokat. A halált leggyakrabban agyvérzés vagy baleset okozta, ritkábban stroke vagy tumor bizonyult végzetesnek. Az egyének elhalálzásának körülményei semmilyen összefüggést nem mutattak a CYP enzimaktivitásokkal.

5.2.2 *CYP2C19* és *CYP2D6* allélgyakoriságok a májszövet donoroknál

Irodalmi adatok alapján a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló, és az enzimfunkciót befolyásoló allélvariánsokat vizsgáltuk. Ennek fényében a *CYP2C19* genotípus megállapításához a *CYP2C19**2 (19154G>A), *CYP2C19**3 (17948G>A), *CYP2C19**4 (1A>G) és a *CYP2C19**17 (-806C>T) allélokra jellemző SNP-k kimutatását végeztük el 114 magyarországi szervdonor májszövetét felhasználva. Amennyiben polimorf allélvariáns nem volt jelen, a genotípust homozigóta vadnak (*CYP2C19**1/*1) tekintettük. A kapott allélgyakoriságokat összevetettük a kaukázusi populációra vonatkozó irodalmi adatokkal (15. táblázat). A leggyakrabban előforduló, funkcióvesztéssel járó polimorf allélvariánsnak a *CYP2C19**2 bizonyult, míg a *CYP2C19**3 és *CYP2C19**4 variánsokat egyik donor sem hordozta. A *CYP2C19**2, *3 és *4 allél gyakorisága nem tért el számottevően a szakirodalomban fellelhető, a kaukázusi populációra vonatkozó gyakorisági adatoktól, ugyanakkor a *CYP2C19**17 gyakorisága a vizsgált populációban a kaukázusinál némileg magasabbnak adódott, azonban ez az adott, viszonylag alacsony mintaszám mellett nem feltétlenül jelentett szignifikáns különbséget. A *CYP2C19**2/*2 diplotípust csupán egy donor hordozta, ezzel szemben a *CYP2C19**17 allélvariáns nyolc donor esetén fordult elő homozigóta formában. Az ellentétes hatású *CYP2C19**2 és *CYP2C19**17 allélvariánsok kombinációja (*CYP2C19**2/*17 diplotípus) 12 donor esetén volt azonosítható. A *CYP2C19* allélvariánsokra jellemző mutációs pontok kapcsoltságának vizsgálatának eredménye alapján - az irodalommal egybehangzóan [Pedersen *et al.* 2010] - megállapítható a 19154G>A (*CYP2C19**2) és a -806C>T (*CYP2C19**17) teljes kapcsoltsága, azaz azonos haplotípuson a 19154A (*CYP2C19**2) kizárólag a -806C-al fordult elő és a -806T (*CYP2C19**17) soha nem fordult elő a 19154A-al azonos haplotípuson belül.

A donorok *CYP2D6* genotípusának meghatározása a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló, funkcionális hatással bíró polimorfizmusaira, így a *CYP2D6**3 (2550delA), *CYP2D6**4 (1847G>A), *CYP2D6**5 (teljes gén deléció), *CYP2D6**6 (1708delT), *CYP2D6**10 (100C>T), *CYP2D6**41 (2989G>A) allélvariánsok, valamint a génduplikáció/multiplikáció kimutatására terjedt ki. A fenti polimorf allélok hiányában a donor genotípusát *CYP2D6**1/*1-nek tekintettük. Mivel korábbi tanulmányok a promóter régióban található -1584A>G SNP-t összefüggésbe hozták a *CYP2D6* fokozott expressziójával [Llerena *et al.* 2013; Dorado *et al.* 2009], ezért a homozigóta vad genotípussal rendelkező donoroknál elvégeztük a -1584A>G polimorfizmus kimutatását, és vizsgáltuk szerepét az UM fenotípus kialakításában. A *CYP2D6* gén működésképtelenségét leggyakrabban a *CYP2D6**4 allélvariáns jelenléte okozta, míg a *CYP2D6**3, *CYP2D6**5 és *CYP2D6**6 variánsokat csak elvéve detektáltunk (15. táblázat).

Génduplikáció/multiplikáció rendkívül gyakran fordult elő a vizsgált populációban, ami bár lényegesen magasabb a magyar [Rideg *et al.* 2011] és más kaukázusi populáción [Barclay *et al.* 2003; Scordo *et al.* 2004; Gaedigk *et al.* 2008] végzett tanulmányok által közölt értéknél, a viszonylag alacsony mintaszám mindenképp árnyalja az eltérést. A csökkent aktivitást előidéző variánsok nagyobb részét a *CYP2D6**41 tette ki, míg a *CYP2D6**10 allélvariáns ritkábban fordult elő.

15. táblázat. CYP allélgyakoriság adatok

Allélgyakoriság (%)		
CYP2C19	<i>Magyarországi szervdonorok (N=114)</i>	<i>Kaukázusi populáció</i> ^[Zhou <i>et al.</i> 2017, Fricke-Galindo <i>et al.</i> 2016]
*2	18,4	12-18
*3	0	<1
*4	0	<1
*17	26,3	20-22
CYP2D6	<i>Magyarországi szervdonorok (N=128)</i>	<i>Kaukázusi populáció</i> ^[Zanger és Schwab 2013; Zhou <i>et al.</i> 2017]
*3	0,8	1-4
*4	21,9	16
*5	0,8	3
*6	2,7	2
*10	3,5	1-2
*41	7,8	9
Duplikáció/ multiplikáció	19,9	1-9

5.2.3 Összefüggések a CYP enzimaktivitások és a *CYP* genotípus között

Minden egyes szervdonor CYP fenotípus kategorizálását elvégeztük a beazonosított genotípus alapján. Az egyes *CYP2C19* és *CYP2D6* diplotípusok alapján becsült fenotípus kategóriákat a Hicks és mtsai. [Hicks *et al.* 2013] által közölt útmutatásokat felhasználva alakítottuk ki, és a donorokat genotípusuk alapján gyenge (PM), intermedier (IM), extenzív (EM) és ultra-gyors metabolizáló (UM) csoportokba soroltuk (16. táblázat). A genotípus és a fenotípus kapcsolatának felderítéséhez a genotípus-alapú fenotípus besorolást összevetettük a mért mefenitoin 4'-hidroxiláz, illetve dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitás értékek alapján meghatározott fenotípus besorolásokkal.

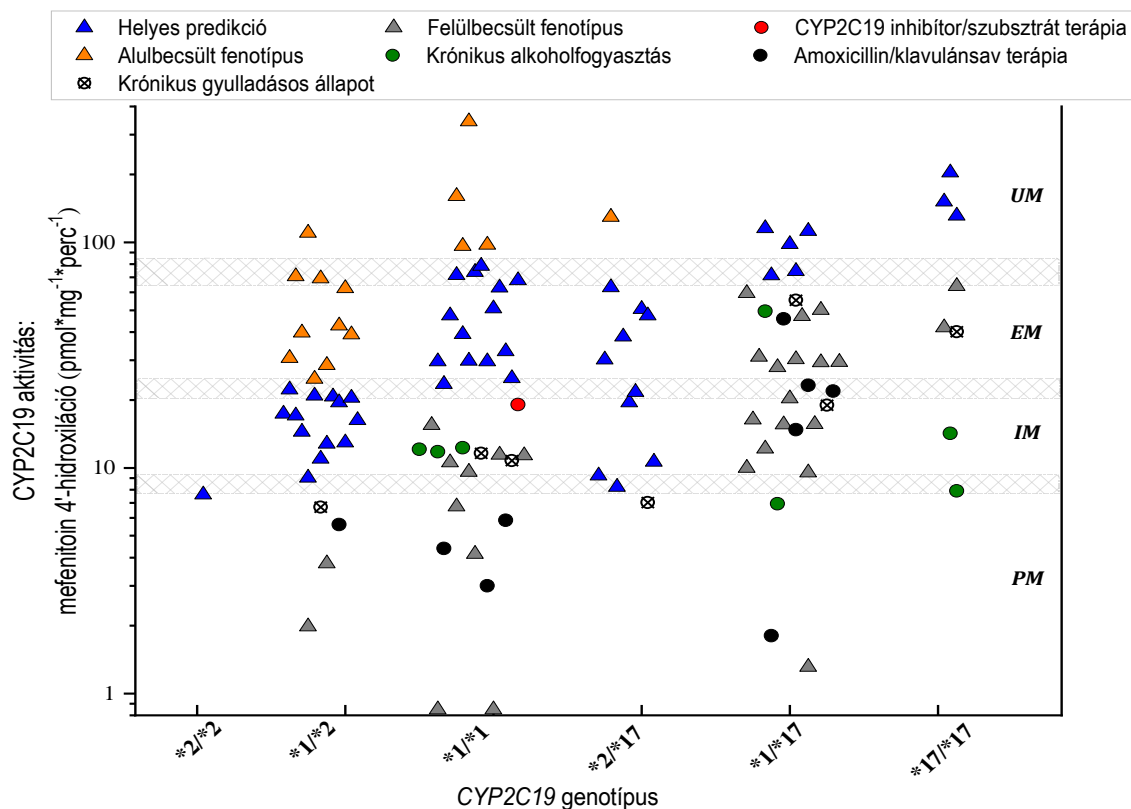
16. táblázat. Genotípus-alapú fenotípus kategorizálás

CYP2C19 genotípus	Becsült fenotípus kategória
<i>*2/*2</i>	PM
<i>*1/*2</i>	IM
<i>*1/*1</i>	EM
<i>*2/*17</i>	IM/EM
<i>*1/*17</i>	UM
<i>*17/*17</i>	UM
CYP2D6 genotípus	
<i>nf/nf</i>	PM
<i>nf/red</i>	PM/IM
<i>*1/nf</i>	IM
<i>*1/red</i>	IM/EM
<i>*1/*1</i>	EM
<i>*1xN/nf</i>	EM
<i>*1/*1xN</i>	UM

PM: gyenge metabolizáló; IM: intermedier metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló; *nf*: működésképtelen allélvariáns (*CYP2D6**3, *4, *5, *6); *red*: csökkent működőképességű allélvariáns (*CYP2D6**10, *41); *1xN: vad allél duplikáció/multiplikáció

5.2.3.1 Összefüggések a CYP2C19 enzimaktivitás és a CYP2C19 genotípus között

A különböző *CYP2C19* genotípusú donorok *CYP2C19* enzimaktivitás értékeit szemlélteti a 12. ábra. Működésképtelen allélt mindössze egyetlen donor hordozott homozigóta formában (*CYP2C19**2/*2), mely ennek megfelelően alacsony *CYP2C19* aktivitást és PM fenotípust mutatott. A vad allél mellett működésképtelen allélt hordozók (*CYP2C19**1/*2) aktivitása széles tartományban változott (2-110 pmol*mg⁻¹*perc⁻¹), a donorok kevesebb mint felét jellemezte a becsült IM fenotípus (13/27), míg néhány donor PM-nek bizonyult (4/27). Ezenfelül 10 heterozigóta donor a vártnál magasabb aktivitással bírt. A 114 vizsgált szervdonorból 36 rendelkezett homozigóta vad genotípussal (*CYP2C19**1/*1), de csak 14 mutatott extenzív metabolizmust, 11 donor IM, 7 PM fenotípus kategóriába került. Négy egyén - a homozigóta vad genotípus ellenére - meglehetősen magas mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitással rendelkezett, így UM-nek minősült. Csaknem az összes (10/12) *CYP2C19**2/*17 diplotípust hordozó donor IM vagy EM csoportba került, kivéve kettő mintát, melyeknek aktivitása csekély mértékben tért el a intermedier-extenzív metabolizáló fenotípus tartománytól. A *CYP2C19**17 allélvariáns vad típusnál magasabb génexpressziója következtében a heterozigóta (*CYP2C19**1/*17) és homozigóta (*CYP2C19**17/*17) formában



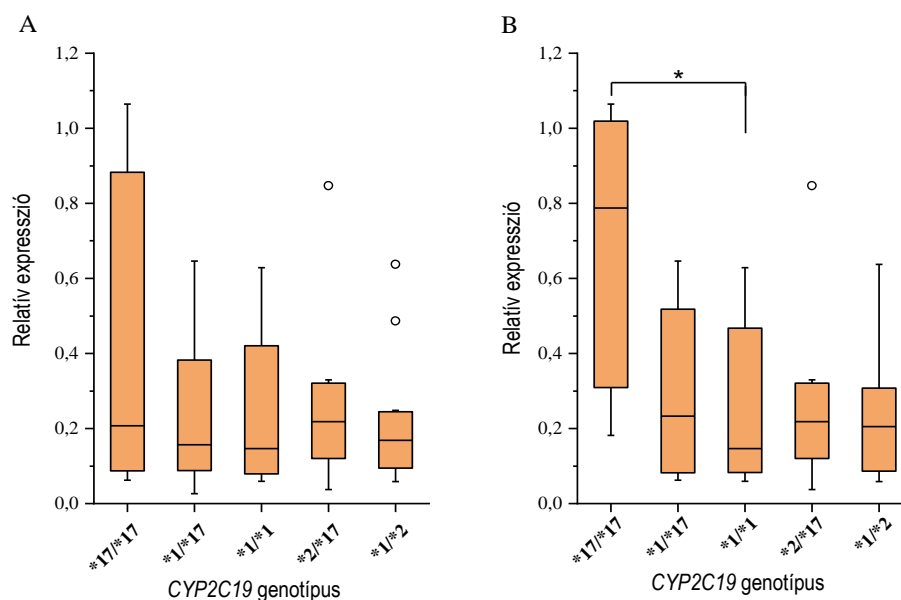
12. ábra. Különböző *CYP2C19* genotípust hordozó humán szerdonorok (N=114) *CYP2C19* aktivitása (mefenitoin 4'-hidroxiláció). PM: gyenge metabolizáló; IM: intermedier metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló

hordozók fenotípusát jellemzően UM-nek becsüli az irodalom. A vizsgálatunkba bevont *CYP2C19**17 allélvariánst heterozigóta (*CYP2C19**1/*17) vagy homozigóta (*CYP2C19**17/*17) formában hordozó donorok mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitása hatalmas eltéréseket mutatott, és csupán töredékük (8/38) bizonyult ultra-gyors metabolizálónak. A *CYP2C19**1/*17 és a *CYP2C19**1/*1 diplotípusok átlagos aktivitása (átlag ± SD) nem mutatott különbséget ($37,17 \pm 31,12 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$ vs. $42,20 \pm 62,41 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$, $P=0,4209$), és bár a *CYP2C19**17/*17 genotípussal rendelkezők magasabb átlagos aktivitást jeleztek a homozigóta vad genotípusú (*CYP2C19**1/*1) egyénekekkel összevetve ($81,77 \pm 71,48 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$ vs. $42,20 \pm 62,41 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$), a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($P=0,0697$). A *CYP2C19* genotípus-alapú fenotípus becslés hatékonyságát összefoglalva, az összes vizsgált donor kevesebb mint felének (40%) genotípusa alapján becsült fenotípus egyezett meg a *CYP2C19* aktivitás alapján megállapított fenotípus kategóriával, a genotípus alapján vártnál magasabb enzimaktivitás mindössze 13%-ukat jellemezte, ellenben jelentős része (47%) a donoroknak a *CYP2C19* genotípus alapján becsültnél alacsonyabb mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitással bírt. A vizsgált egyének anamnéziséből ismert, a májfunkciót illetve a

CYP enzimaktivitást potenciálisan csökkentő tényezők (krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin/klavulánsav és CYP2C19 szubsztrát/inhibitor terápia, krónikus gyulladós állapot) fennállása esetén a donorok kivétel nélkül a vártnál alacsonyabb aktivitást mutattak, mely tényezők összességében a minták 21%-ánál kerültek feljegyzésre (17. és 18. táblázat).

5.2.3.2 A CYP2C19 mRNS expresszió és a CYP2C19*17 allélvariáns kapcsolata

A CYP2C19*17 allélvariánsban megtalálható, a gén promóter régiójában lévő SNP-t (-806C>T) korábbi tanulmányok a CYP2C19 gén fokozott transzkripciójával hozták kapcsolatba [Li-Wan-Po *et al.* 2010; Sanford *et al.* 2013], ezért meghatároztuk a CYP2C19 mRNS szinteket CYP2C19*1 és/vagy CYP2C19*17 allélt hordozó humán szervdonor (N=56) májszövetét felhasználva a génfunkció közvetlen vizsgálatához, majd összefüggéseket kerestünk a CYP2C19 mRNS expresszió és a CYP2C19*17 allélvariáns között. Szignifikáns különbség a CYP2C19 genotípus csoportok között nem volt kimutatható (13A ábra). Tekintve, hogy nem-genetikai tényezők (gyógyszeres kezelés, táplálkozás, betegségek) fenokonverziós hatása jelentősen módosíthatja a májban a CYP expressziót és aktivitást [Shah és Smith 2015], ezért azokat a donorokat, melyek anamnézise krónikus alkoholfogyasztást, amoxicillin/klavulánsav terápiát vagy krónikus gyulladással járó betegséget tartalmazott, kizártuk az értékelésből (13B ábra).



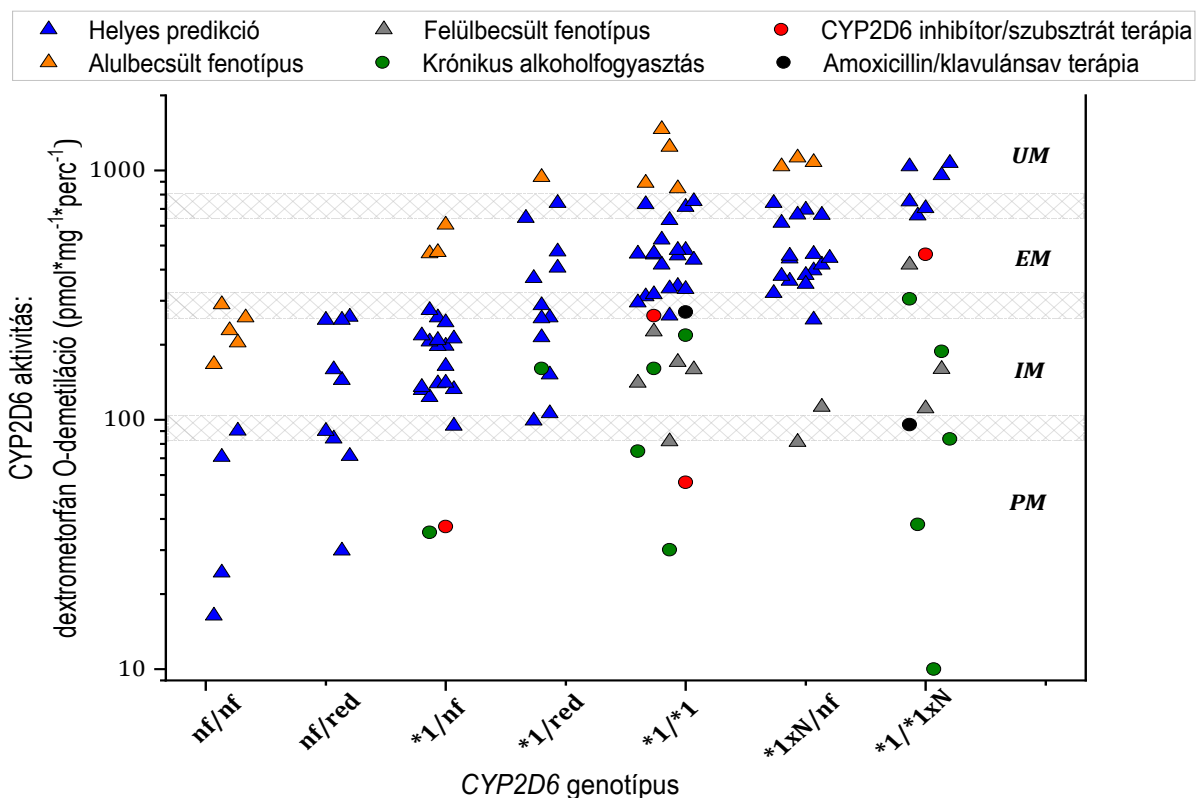
13. ábra. A CYP2C19 genotípus és mRNS expresszió kapcsolata.

Az adatok 56 humán szervdonor májszövetében mért relatív mRNS szinteket ábrázolják (A), illetve relatív expressziós értékeket (N=44) azon donorok kizárása után, amelyeknél nem-genetikai, CYP expressziót befolyásoló tényező állt fenn (B). A doboz diagramon a medián érték, alsó és felső kvartilisek, illetve a minimum és maximum értékek szerepelnek. Az outliereket \circ jelöli. *P<0,05

A homozigóta vad ($CYP2C19^*/1$) genotípusú donorok májszövetében meghatározott CYP2C19 expresszióval összevetve a $CYP2C19^*/2$, a $CYP2C19^*/17$ és a $CYP2C19^*/17$ genotípus csoportokat, nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a CYP2C19 mRNS szintekben, ugyanakkor a $CYP2C19^*/17$ genotípus csoport szignifikánsan magasabb CYP2C19 mRNS expressziót mutatott, mint a homozigóta vad genotípussal rendelkezők ($P=0,0227$).

5.2.3.3 Összefüggések a CYP2D6 enzimaktivitás és a CYP2D6 genotípus között

A CYP2D6 enzim aktivitás és az egyes CYP2D6 genotípus csoportok kapcsolatát a 14. ábra jeleníti meg. Szembetűnő, hogy a vad allélt ($CYP2D6^*/1$) nem hordozó egyének dextrometorfán O-demetiláz aktivitása egységesen alacsony volt, függetlenül attól, hogy két teljes funkcióvesztést okozó allél, vagy egy csökkent aktivitást és egy teljes aktivitás-vesztést okozó allélt hordozott a donor.



14. ábra. Különböző CYP2D6 genotípust hordozó humán szervdonorok (N=128) CYP2D6 aktivitása (dextrometorfán O-demetiláció). PM: gyenge metabolizáló; IM: intermediér metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló; *nf*: működésképtelen CYP2D6 allélvariáns (*3, *4, *5, *6, *4xN); *red*: csökkent működőképességű CYP2D6 allélvariáns (*10 és *41); *xN*: allél duplikáció

A működésképtelen allélok (nf: *CYP2D6**3, *4, *5, *6) homozigóta formában hordozók (*CYP2D6*nf/nf) és az egy csökkent aktivitású allélvariánst (red: *CYP2D6**10, *41) működésképtelen allél mellett hordozók (*CYP2D6*nf/red) átlagos aktivitásai azonosak voltak ($149,77 \pm 102,36 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$ vs. $148,72 \pm 87,13 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$). Bár a pontosan egy vad allélt (*CYP2D6**1) hordozó egyének jellemzően IM-eknek tekintendők, a mért enzimaktivitások alapján - főként a csökkent aktivitást kiváltó allélvariánsok jelenlétének köszönhetően - átfedés tapasztalható az extenzív metabolizálókkal. Mivel a működésképtelen allélvariánsok duplikációja értelemszerűen nem okoz aktivitásbeli változást, ezért a *CYP2D6**1/*4_{xN} és a *CYP2D6**1/*4 genotípusokat azonosnak tekintettük a fenotípus becslésénél. EM fenotípust két funkcionáló vad allél jelenlétében, azaz homozigóta vad *CYP2D6**1/*1 vagy a vad allél duplikációja mellett funkció-vesztő mutációt tartalmazó allél (pl. *CYP2D6**1_{xN}/*4) esetén becsültünk. A két vad allélt hordozó donorok a vizsgált populációnak 45%-át tették ki. Közülük 7 donor a genotípus alapján becsült EM fenotípus helyett ultra-gyors metabolizáló fenotípust mutatott (dextrometorfán *O*-demetiláció $>720 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$). Továbbá két donor *CYP2D6**1/*1 diplotípus mellett kiugróan magas aktivitást produkált (1242 és 1461 $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$), ami feltehetően a promóter régió -1584 pozíciójában heterozigóta (-1584C/G), illetve homozigóta (-1584G/G) formában hordozott SNP-knek és a *CYP2D6* fokozott transzkripciójának tulajdonítható. A homozigóta vad genotípusú donorok egyharmad része (12/36) azonban a genotípus alapján vártnál alacsonyabb *CYP2D6* aktivitással bírt, melyek közül négy esetben krónikus alkoholfogyasztás, kettő esetben *CYP2D6* szubsztrát/inhibitor (béta-blokkoló, haloperidol) illetve egy esetben amoxicillin/klavulánsav terápia állt fenn. Az UM fenotípus jellemzően a *CYP2D6* gén duplikációjának/multiplikációjának tudható be, azonban vizsgálatunkban a 13 ultra-gyors dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitást mutató donor ($>720 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$) közül csak négy hordozott kettőnél több vad allélt (*CYP2D6**1/*1_{xN}).

Összességében a vizsgált májszövet donorok kétharmad részénél (86/128) hatékonyan tudtuk becsülni a fenotípust a *CYP2D6* genotípus alapján. 16 donor májszövet mintája (12,5%) a vártnál magasabb aktivitást mutatott, közülük 5 esetben volt jelen a korábban fokozott expresszióval összefüggésbe hozott -1584G SNP a *CYP2D6* gén promóter régiójában. A genotípus alapján vártnál alacsonyabb dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitás némileg nagyobb számban fordult elő a vizsgált populációban (26/128), közülük számos donor - dacára a kettő vagy akár több vad allél jelenlétének - PM fenotípusba tartozott és meglehetősen alacsony enzimaktivitást ($<100 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{perc}^{-1}$) mutatott. Külső, CYP enzim-funkciót befolyásoló

tényezőt - mint krónikus alkoholfogyasztást, CYP2D6 szubsztrát/inhibitor vagy amoxicillin/klavulánsav terápiát - 17 donor anamnézise tartalmazott.

A CYP2C19 és a CYP2D6 *in vitro* genotípus-alapú fenotípus becslés eredményeit a 17. és a 18. táblázat foglalja össze.

17. táblázat. A genotípus-alapú fenotípus becslés hatékonysága

	Alulbecsült fenotípus		Elfogadható becslés		Felülbecsült fenotípus	
	N	%	N	%	N	%
CYP2C19	15	13,2	46	40,3	53	46,5
CYP2D6	16	12,5	86	67,2	26	20,3

18. táblázat. Nem-genetikai tényezők feltételezett fenokonverziós hatása

	Krónikus alkoholfogyasztás	CYP2C19/2D6 szubsztrát/inhibitor	Amoxicillin/klavulánsav terápia	Krónikus gyulladási állapot
CYP2C19	EM→IM (N=3) UM→EM (N=1) UM→IM (N=1) UM→PM (N=2)	EM→IM (N=1)	IM→PM (N=1) EM→PM (N=3) UM→EM (N=1) UM→IM (N=3) UM→PM (N=1)	IM→PM (N=2) EM→IM (N=2) UM→EM (N=2) UM→PM (N=1)
CYP2D6	IM→PM (N=1) EM→IM (N=2) EM→PM (N=2) UM→IM (N=2) UM→PM (N=3)	IM→PM (N=1) EM→IM (N=1) EM→PM (N=1) UM→EM (N=1)	UM→PM (N=1)	-

PM: gyenge metabolizáló; IM: intermediér metabolizáló; EM: extenzív metabolizáló; UM: ultra-gyors metabolizáló

5.3 A CYP fenotípus becslés klinikai alkalmazhatósága

Az *in vitro* CYP genotípus-alapú fenotípus becslés vizsgálatok eredménye közvetlen információt szolgáltat arról, hogy a CYP genotípus milyen mértékben határozza meg az adott enzim fenotípusos kifejeződését. Ezen túlmenően vizsgálatainkat kiterjesztettük klinikai minták elemzésével, így képet kaphatunk arról, hogy az *in vitro* kísérleti körülményekből nyert tapasztalataink mennyiben érvényesek a lényegesen bonyolultabb *in vivo* körülmények között, és ezek a tapasztalatok felhasználhatók-e a klinikai gyakorlatban. Két atípusos antipszichotikum, a klozapin és az aripiprazol vérszintje valamint a betegek CYP2C19 és CYP2D6 genotípusa közti összefüggéseket vizsgáltuk. *In vitro* vizsgálatok alapján a klozapin metabolizmusában a CYP2C19 szerepe feltételezhető a CYP1A2, CYP3A4 és CYP2D6

mellett. Ugyanakkor *in vivo* jelentősége nem tisztázott, ezért a *CYP2C19* genotípus, az mRNS expresszió és a klozapin vérszintek kapcsolatát vizsgáltuk pszichiátriai betegek vérmintáit felhasználva. Számos közlemény igazolta, hogy az aripiprazol lebontását főként a *CYP2D6* és kisebb mértékben a *CYP3A* enzimek végzik. Ezért elsősorban a betegek *CYP2D6* genotípusának szerepére fókuszáltunk, illetve ezt egészítettük ki a *CYP3A* genotípus illetve mRNS expresszió, és az aripiprazol és dehidro-aripiprazol vérszintek összefüggéseinek vizsgálatával. Végül - a fenokonverzió egy lehetséges forrásaként - az aripiprazol mellett gyakran alkalmazott hatóanyagok esetleges *CYP2D6* gátló hatásának jelentőségét vettük számba.

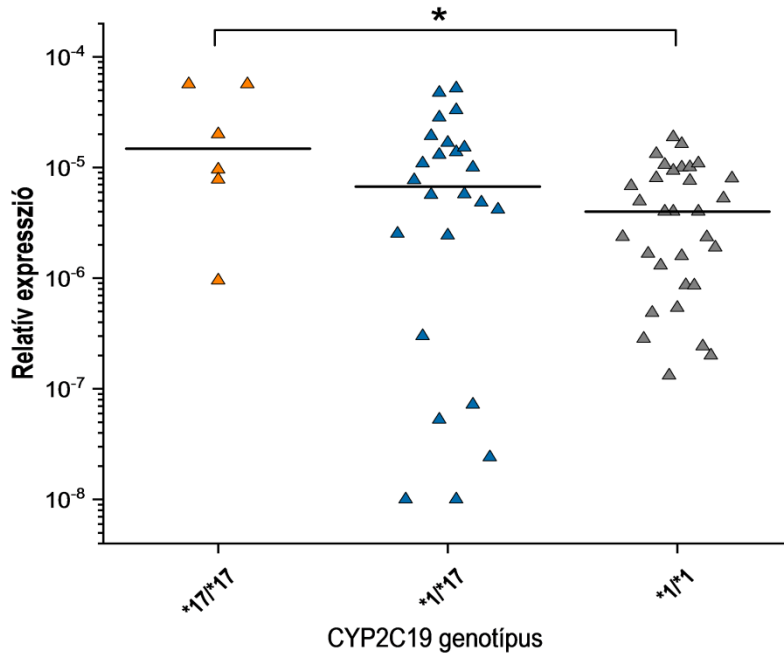
5.3.1 *CYP2C19* genotípus-alapú fenotípus becslés alkalmazhatósága klozapin terápia során

A vizsgálatba bevont 116 pszichiátriai beteg klozapin dózis és vérszint adatait, valamint *CYP2C19* státuszát a 19. táblázat tartalmazza. A genotípusok alapján a betegcsoport *CYP2C19* allélgyakoriságai (*CYP2C19*1* 62,9%; *CYP2C19*2* 12,9%; *CYP2C19*3* 1,3%; *CYP2C19*4* 1,7%; *CYP2C19*17* 21,1%) nem tértek el a kaukázusi populációt jellemző gyakoriságoktól (az irodalmi adatokat ld. a 3. táblázatban).

19. táblázat. Klozapinnal kezelt betegek dózis, vérszint adatai és *CYP2C19* státusza

	N	%
Klozapin dózis (mg/nap)*	175 (12,5; 700)	
Vérszint (ng/ml)		
Klozapin*	181 (3,3; 1400)	
Norklozapin*	145 (4,5; 894)	
Klozapin N-oxid*	80,2 (0; 383)	
<i>CYP2C19</i> genotípus	116	100
<i>CYP2C19*1/*1</i>	45	38,8
<i>CYP2C19*1/*2</i>	21	18,1
<i>CYP2C19*1/*3</i>	2	1,7
<i>CYP2C19*1/*4</i>	4	3,4
<i>CYP2C19*2/*2</i>	1	0,9
<i>CYP2C19*2/*3</i>	1	0,9
<i>CYP2C19*1/*17</i>	29	25,0
<i>CYP2C19*2/*17</i>	6	5,2
<i>CYP2C19*17/*17</i>	7	6,0
<i>CYP2C19</i> mRNS expresszió	83	100
alacsony expresszálók	23	27,7
átlagos expresszálók	36	43,4
magas expresszálók	24	28,9

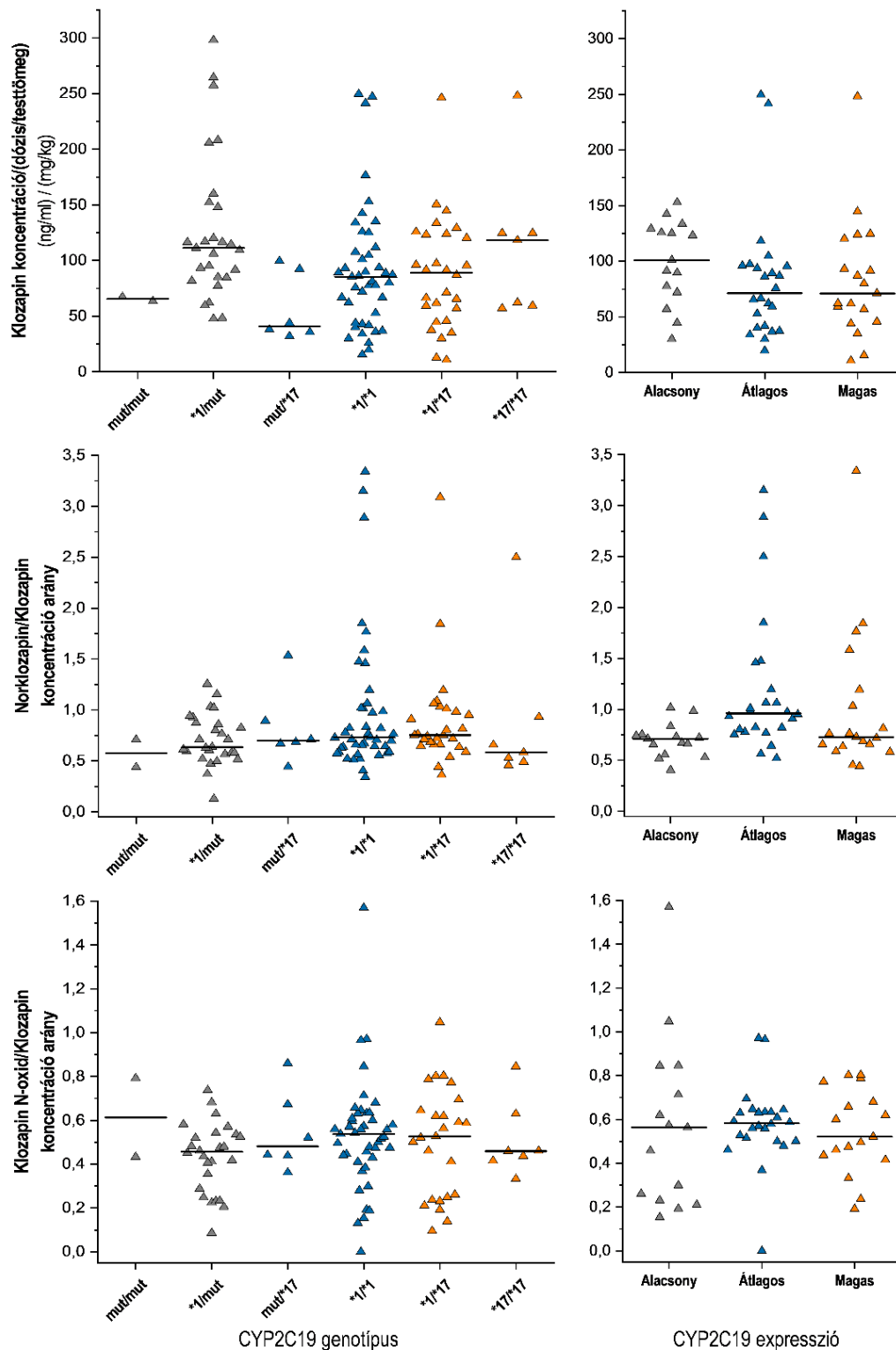
*medián (min; max)



15. ábra. A *CYP2C19**17 hatása a *CYP2C19* mRNS expresszióra (N=61). vonal: medián; *P<0,05

A betegek kevesebb mint 40%-a hordozott homozigóta vad genotípust, a két leggyakrabban előforduló polimorf diplotípus a *CYP2C19**1/*2 (18,1%) és a *CYP2C19**1/*17 (25,0%) volt, míg a *CYP2C19**3 és *CYP2C19**4 allélvariánsok csak elvétve fordultak elő. A 116 vérmintából 83 esetben tudtunk *CYP2C19* mRNS expressziót mérni, mivel néhány beteg vérmintája csak korlátozott mennyiségben állt rendelkezésünkre. Egyértelmű trend mutatkozott a feltételezhetően fokozott génexpresszióval járó *CYP2C19**17 allélvariánst homozigóta, heterozigóta formában hordozók, illetve a variánst nem hordozók *CYP2C19* mRNS szintjeit vizsgálva (15. ábra), miszerint a homozigóta vad genotípushoz (*CYP2C19**1/*1) képest mérsékelten, de nem szignifikánsan magasabb expresszió jellemezte a *CYP2C19**1/*17 diplotípust hordozókat (P=0,2), míg - az *in vitro* eredményeinkkel összhangban - a különbség a *CYP2C19**17/*17 diplotípus esetén már statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (P=0,03). Ezenfelül a *CYP2C19**17 hordozó betegek gyakrabban kerültek magas *CYP2C19* expressziós kategóriába, mint a homozigóta vad genotípussal rendelkezők (16/33 vs. 6/31; P<0,05). Eredményeink a betegek *CYP2C19* metabolikus kapacitása tekintetében azt mutatják, hogy a *CYP2C19**17 allélvariánst hordozók körében jelentősen megnő a magas *CYP2C19* expresszió valószínűsége, ami extenzív metabolizáló fenotípushoz vezet.

Korábbi tanulmányokban a *CYP2C19* enzim szerepe a klozapin *in vitro* metabolizmusában [Linnet és Olesen 1997], valamint a *CYP2C19* genotípus szerepe a klozapin vérszint (*in vivo*) kialakulásában [Jaquenoud Sirot *et al.* 2009] is felvetődött, ezért megvizsgáltuk a pszichiátriai



16. ábra. A *CYP2C19* genotípus (N=116), mRNA expresszió (N=58) és a klozapin, norklozapin, klozapin N-oxid szérumszint koncentráció kapcsolata. Mivel a *CYP2C19**2 és *3 allélvariánsok expressziója nem befolyásolja a fenotípust, ezért ezen allélvariánsokat hordozókat kizártuk az mRNA expressziós vizsgálatokból. vonal: medián; mut: *CYP2C19**2, *3, *4

betegek vérmintáját felhasználva a *CYP2C19* genotípus, illetve a *CYP2C19* mRNA expresszió kapcsolatát a betegek szérumban klorzapin, nor-klorzapin és klorzapin N-oxid koncentrációival (16. ábra). Statisztikailag szignifikáns különbséget a klorzapin, nor-klorzapin és a klorzapin N-oxid vérszintekben sem az egyes diplotípusok, sem a *CYP2C19* expressziós kategóriák között nem találtunk. Bár a *CYP2C19* alacsony expresszálóknak némileg magasabb klorzapin vérszinteket mutattak az átlagos expresszálókhöz viszonyítva, ez nem bizonyult szignifikáns eltérésnek ($P=0,055$). Összességében megállapítható, hogy a klorzapin metabolizmusában a *CYP2C19* genotípusnak és a *CYP2C19* expresszióknak, így a *CYP2C19* metabolikus kapacitásnak nincsen számottevő szerepe.

5.3.2 *CYP2D6* genotípus-alapú fenotípus becslés alkalmazhatósága aripiprazol terápia során

A vizsgálatokba 93 aripiprazol terápián lévő pszichiátriai beteget vontunk be. A betegek közül 52 hordozott legalább egy működésképtelen (*CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6*) vagy csökkent működőképességű (*CYP2D6*10*, *CYP2D6*41*) allélvariánst, ezenkívül 5 betegnél a *CYP2D6* vad allél duplikációját (*CYP2D6*1/*1xN*) detektáltuk, amelynek jelenlétében a gén fokozott expresszióját feltételezhetjük (20. táblázat).

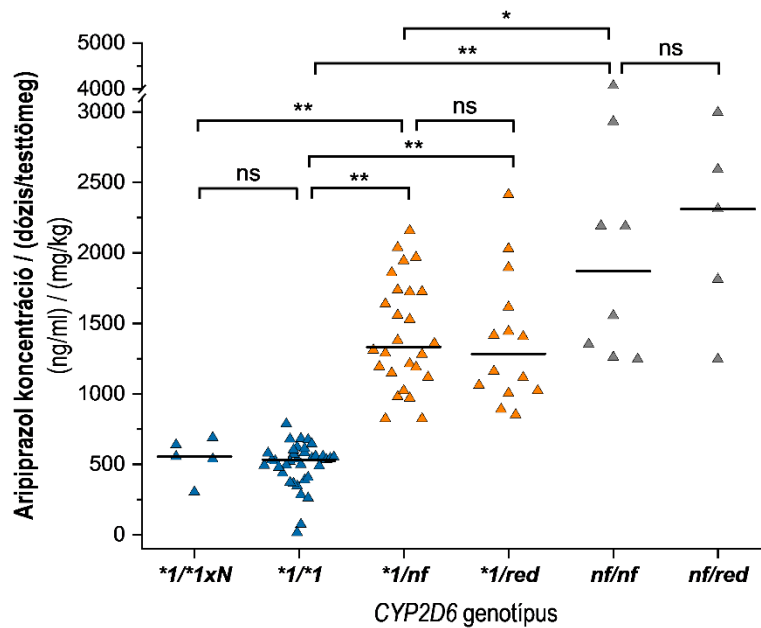
A *CYP2D6* genotípus szoros összefüggést mutatott a normalizált aripiprazol vérszintekkel (17. ábra). Szignifikánsan magasabb normalizált aripiprazol szérumban koncentrációkat figyeltünk meg a működésképtelen vagy csökkent működőképességű *CYP2D6* allélok hordozó betegek esetén (*CYP2D6*1/nf*, *CYP2D6*1/red*, vagy *CYP2D6*1/nf/nf*, *CYP2D6*1/red/red*), mint a homozigóta vad genotípust (*CYP2D6*1/*1*) vagy duplikációt (*CYP2D6*1/*1xN*) hordozóknál ($1421 \pm 384,3$; $1379 \pm 466,5$ vagy $2221 \pm 1003,7$; $2191 \pm 682,7$ vs. $494,3 \pm 158,3$ vagy $543,6 \pm 148,7$ [ng/ml]/[mg dózis/kg]; $P < 0,0001$). Továbbá szignifikáns különbség mutatkozott az egy és a két működésképtelen vagy csökkent működőképességű allélt hordozók között ($P < 0,01$). Bár *CYP2D6*1* duplikáció jelenlétében nem tapasztaltunk alacsonyabb aripiprazol vérszinteket a homozigóta vad genotípusú betegekhez képest, a duplikációt hordozók alacsony száma miatt ez a megállapítás mindenképp megerősítésre szorul. Mivel a *CYP2D6*1/nf* és a *CYP2D6*1/red* diplotípusok, illetve a *CYP2D6*1/nf/nf* és a *CYP2D6*1/red/red* diplotípusok aripiprazol szérumban szintjei között nem volt szignifikáns különbség, ezért ezen genotípus csoportokat a továbbiakban összevontuk, és rendre a *CYP2D6*1/mut*, illetve a *CYP2D6*1/mut/mut* csoportokat alkották. Így a későbbiekben a *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*10* és a *CYP2D6*41* allélvariánsokra egyaránt a *CYP2D6*1/mut* jelölést alkalmaztuk.

20. táblázat. Aripiprazollal kezelt betegek dózis, vérszint adatai és CYP státusza

Aripiprazol dózis (mg/nap)*	15 (5; 30)	
Vérszint (ng/ml)		
Aripiprazol*	193 (6,2; 819)	
Dehidro-aripiprazol*	86,8 (4,94; 284)	
CYP genotípus	N	%
CYP2D6		
<i>CYP2D6*1/*1</i>	36	38,7
<i>CYP2D6*1/nf**</i>	26	28,0
<i>CYP2D6*1/red***</i>	14	15,0
<i>CYP2D6nf/nf**</i>	7	7,5
<i>CYP2D6nf/red***</i>	5	5,4
<i>CYP2D6*1/*1xN</i>	5	5,4
CYP3A4		
<i>CYP3A4*1/*1</i>	80	86
<i>CYP3A4*1/*1B</i>	4	4,3
<i>CYP3A4*1/*22</i>	9	9,7
CYP3A5		
<i>CYP3A5*1/*3</i>	8	8,6
<i>CYP3A5*3/*3</i>	85	91,4
CYP3A4 mRNS expresszió		
alacsony expresszálók	14	15,0
átlagos expresszálók	77	82,8
magas expresszálók	2	2,2

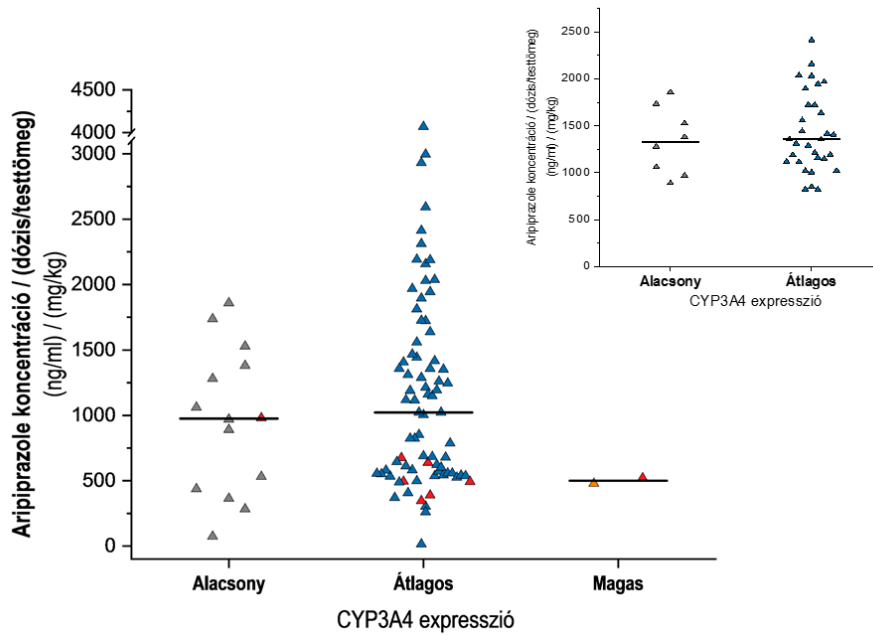
*medián (min; max); ** *CYP2D6nf*: működésképtelen allélvariáns (*3, *4, *5, *6, *4xN);

*** *CYP2D6red*: csökkent működőképességű allélvariáns (*10 és *41)



17. ábra. A *CYP2D6* genotípus hatása a normalizált aripiprazol vérszintekre (N=93). *vonal*: medián; *nf*: működésképtelen *CYP2D6* allélvariáns (*3, *4, *5, *6, *4xN); *red*: csökkent működőképességű *CYP2D6* allélvariáns (*10 és *41); *xN*: allél duplikáció; ns: statisztikailag nem szignifikáns; *P<0,01; **P<0,0001

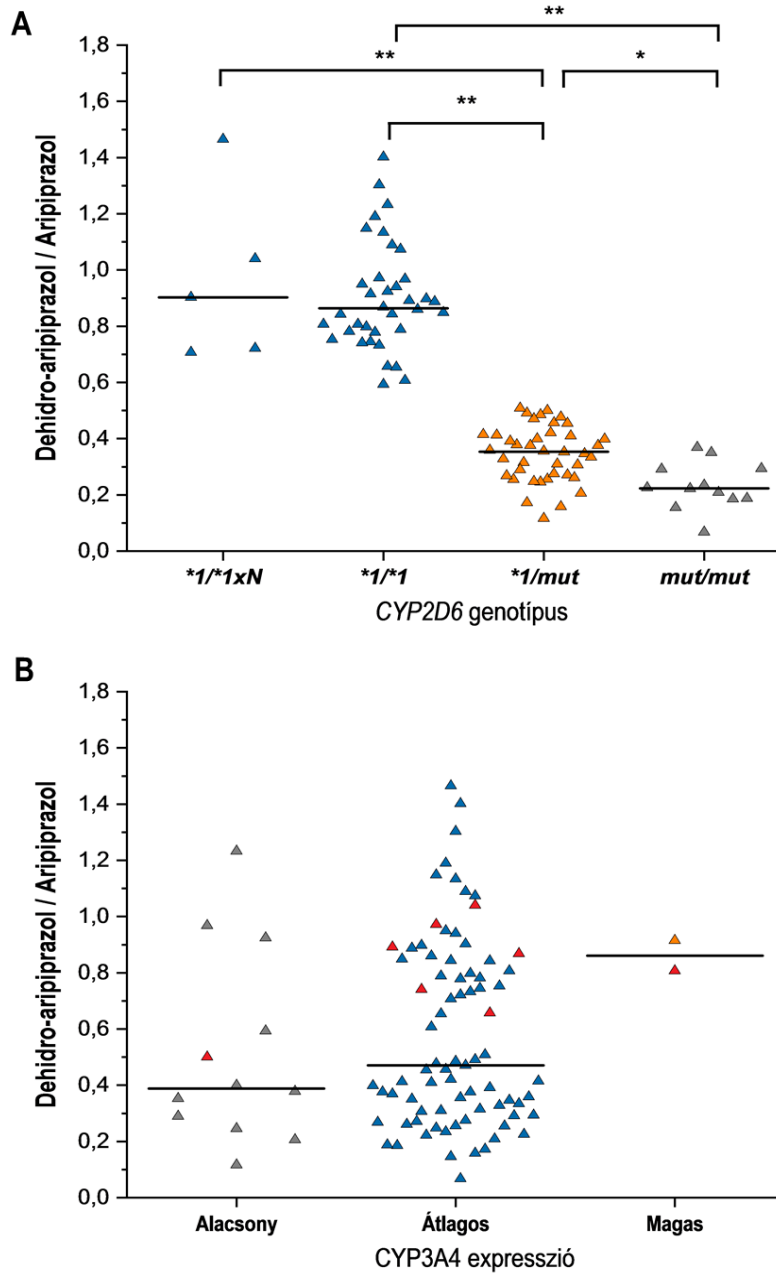
Az aripiprazol metabolizmusában a CYP3A enzimek szerepe számos tanulmányban felvetődött [Kirschbaum *et al.* 2008; Bachmann *et al.* 2008; Gründer *et al.* 2008], ezért az aripiprazol szérumszintek és a pszichiátriai betegek CYP3A státuszának kapcsolatát szintén vizsgáltuk. A *CYP3A4* gén fokozott transzkripciójával összefüggésbe hozott *CYP3A4*1B* allélvariáns négy, míg a csökkent transzkripcióval járó *CYP3A4*22* allél kilenc betegnél fordult elő, azonban ezek a genetikai polimorfizmusok nem magyarázták a CYP3A4 expresszió nagyfokú egyéni eltéréseit, melynek hátterében a *CYP3A4* gén expresszióját számottevően befolyásoló egyéb, nem-genetikai tényezők hatását feltételezhetjük. A mért CYP3A4 mRNA szintek alapján a betegek több mint 80%-a átlagos expresszióval bírt (20. táblázat). Mindazonáltal a CYP3A4 expresszió és a betegek aripiprazol vérszintjei között összefüggés nem mutatkozott (18. ábra). Továbbá a működőképes *CYP3A5* allélt (*CYP3A5*1*) hordozók és a CYP3A5-t nem expresszáló homozigóta (*CYP3A5*3/*3*) egyének aripiprazol szérumszintjei között nem találtunk különbséget. Mivel feltehető, hogy a CYP3A4 szerepe az aripiprazol metabolizmusban kizárólag működésképtelen vagy csökkent működőképességű *CYP2D6* allélokkal rendelkező betegeknél érvényesül, ezért a betegek *CYP2D6* genotípus szerinti csoportosítását követően is megvizsgáltuk a CYP3A4 expresszió és az aripiprazol vérszintek kapcsolatát. Nem találtunk különbséget a *CYP2D6*1/mut* diplotípust hordozó



18. ábra. A CYP3A státusz (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 mRNS expresszió) hatása a normalizált aripiprazol vérszintekre (N=93). A beillesztett diagramon kizárólag a *CYP2D6**1/*mut* genotípust hordozók szerepelnek. vonal: medián; ▲: *CYP3A5**1 hordozó

alacsony és átlagos CYP3A4 expresszálók között ($1337,5 \pm 355,5$ vs. $1430,3 \pm 423,2$ [ng/ml]/[mg/kg]; $P=0,5729$) (18. ábra, beillesztett diagram), míg a *CYP2D6**mut/mut* genotípust hordozó betegek mindegyikét átlagos CYP3A4 expresszió jellemezte, így utóbbi esetben a CYP3A4-nek az aripiprazol metabolizmusában képviselt jelentőségéről következtetést nem vonhatunk le.

Az aktív metabolit dehidro-aripiprazol szérumban koncentrációk széles tartományban változtak a betegeknél (4,94-284 [ng/ml]/[mg/kg]), és képződése kizárólag a *CYP2D6* genotípussal mutatott összefüggést (19A ábra), míg a dehidro-aripiprazol/aripiprazol arányok az alacsony, átlagos és magas CYP3A4 expresszióval rendelkező betegek között nem tértek el (19B ábra). A *CYP2D6* homozigóta vad (*CYP2D6**1/*1) vagy duplikációt hordozók (*CYP2D6**1/*1xN) dehidro-aripiprazol/aripiprazol arányai szignifikánsan magasabbak voltak az egy vagy két működésképtelen, illetve csökkent működőképességű allélokot hordozó (*CYP2D6**mut*) betegekkel összevetve ($0,9 \pm 0,191$ vagy $0,967 \pm 0,310$ vs. $0,346 \pm 0,099$ és $0,232 \pm 0,085$; $P<0,0001$). Továbbá kismértékű, de statisztikailag szignifikáns eltérés volt kimutatható az egy és a két működésképtelen vagy csökkent működőképességű allélokot hordozók között ($P<0,001$).



19. ábra. A *CYP2D6* genotípus (A) és a *CYP3A4* mRNA expresszió (B) hatása a dehidro-aripiprazol/aripiprazol szérumban való koncentráció arányára. *vonal*: medián; *mut*: működésképtelen vagy csökkent működőképességű *CYP2D6* allélvariáns (*3, *4, *5, *6, *4xN, *10 és *41); xN: allél duplikáció; ns: statisztikailag nem szignifikáns; *P<0,001; **P<0,0001; ▲ : *CYP3A5*1* hordozó

Az aripiprazol steady-state koncentrációját befolyásoló legfontosabb tényezők beazonosítása céljából PLS modellezést alkalmaztunk, melynek független változói a betegek testtömege, a napi aripiprazol dózis, a CYP3A státusz (*CYP3A4* és *CYP3A5* genotípus, illetve *CYP3A4* mRNA expresszió) és a *CYP2D6* genotípus, míg függő változója az aripiprazol szérumszint koncentrációja (ng/ml) volt (20A ábra). A végleges modellben csak azokat a független változókat vettük figyelembe, amelyek - a főkomponens analízis során kapott együtthatók alapján - szignifikáns mértékben hozzájárultak a függő változó kialakításában. Következésképp, mint független változót kizártuk a modelltől a *CYP3A4* genotípust, hiszen a *CYP3A4* mRNA szint tükrözi a *CYP3A4*1B* és *CYP3A4*22* allélvariánsok esetleges hatását. Ezenkívül a *CYP2D6*1/*1* és a *CYP2D6*1/*1xN* diplotípus csoportokat összevontuk, mivel ezen csoportok között az összehasonlító vizsgálatok eredményei alapján nem volt kimutatható eltérés az aripiprazol szérumszint koncentrációk tekintetében. Így a PLS modell végső független változói a betegek testtömege, az aripiprazol dózis, valamint a *CYP2D6* genotípus maradtak, melyek felhasználásával a következő lineáris összefüggést kaptuk az aripiprazol vérszint predikciójához:

$$cc_{\text{aripiprazol}} = 133,57 - 0,556 \times ttmg + 8,77 \times D + konstans_{\text{CYP2D6}}$$

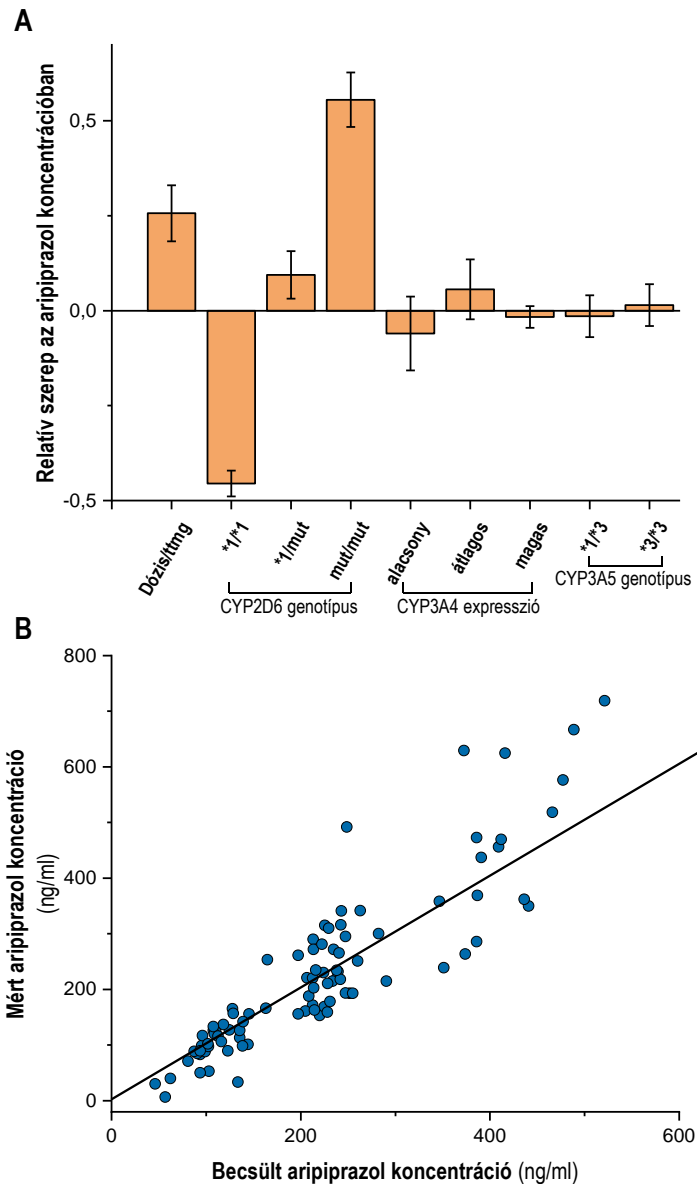
ahol $cc_{\text{aripiprazol}}$ a modell alapján becsült aripiprazol szérumszint koncentráció (ng/ml), $ttmg$ a betegek testtömege (kg), D a napi aripiprazol dózis (mg), $konstans_{\text{CYP2D6}}$ pedig a különböző *CYP2D6* genotípusokra jellemző együttható, amelyeket a 21. táblázat foglal össze. A regresszió pontosságát jellemző paraméterek ($R^2=0,82$; $Q^2=0,8$) alapján a modell igen hatékony predikcióval bír. Továbbá a modellen sikeresen végeztük el a permutációs tesztet, mely jelzi, hogy a függő változó rendkívül érzékeny a független változókra, és - ebből kifolyólag - a modell predikciós ereje nagy. Az R^2 és Q^2 értékek alapján az aripiprazol szérumszint koncentrációkban mutatkozó variabilitás legnagyobb része (>80%) az aripiprazol dóziséből, a betegek testtömegeiből és *CYP2D6* genotípusából eredeztethető, míg az eltérések kevesebb mint

21. táblázat. Az aripiprazol vérszintek becslésére alkalmazott modell együtthatói

<i>CYP2D6</i> genotípus	<i>*1/*1(xN)</i>	<i>*1/mut</i>	<i>mut/mut</i>
Konstans_{CYP2D6}	-132,89	32,52	210,94

*mut: CYP2D6*3, *4, *5, *6, *4xN, *10 és *41; xN: allél duplikáció*

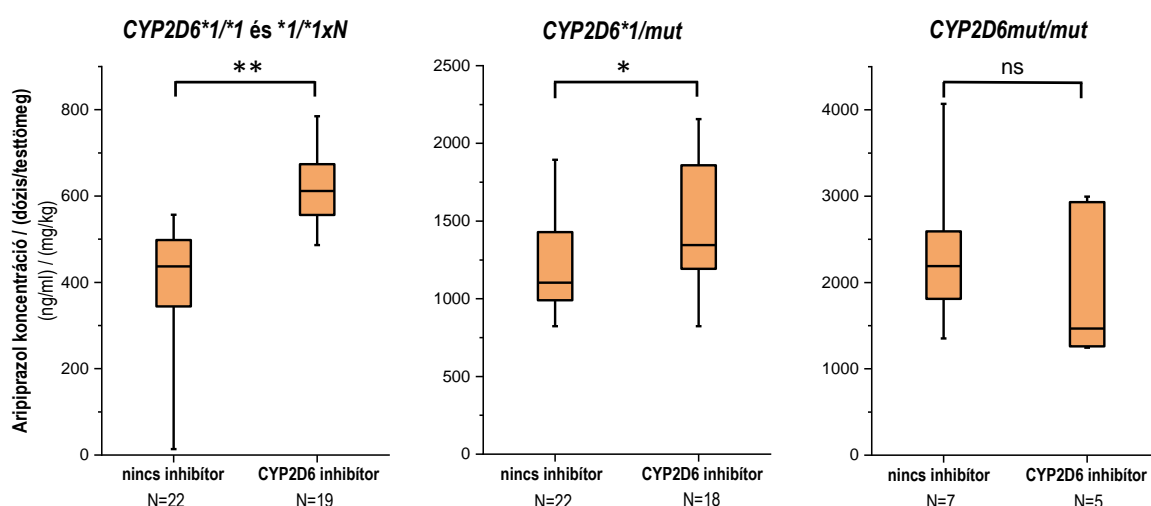
20%-át nem magyarázta a modell (20B ábra). A *CYP2D6* genotípus jelentőségét támasztja alá, hogy utóbbi tényező nélkül a predikciós modell az aripiprazol vérszintek variabilitásának alig 13%-át magyarázta.



20. ábra. Az aripiprazol szérumszintjét befolyásoló tényezők PLS modellezése. Főkomponens analízis az aripiprazol dózis/testtömeg, *CYP2D6* és *CYP3A5* genotípus, valamint a *CYP3A4* mRNS expresszió független változókkal (A). Aripiprazol szérumszintje becslése PLS modell segítségével (B). ttmg: testtömeg (kg); mut: *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *4xN, *10 és *41

5.3.3 A párhuzamosan alkalmazott gyógyszeres kezelés és az aripiprazol expozíció

A vizsgálatba bevont 93 beteg közül mindössze 15 beteg részesült aripiprazol monoterápiában, a betegek nagyobbik része párhuzamosan egyéb antipszichotikum (quetiapin, klozapin, haloperidol, risperidon) vagy antikonvulzáns (lamotrigin, valproát, klonazepám) kiegészítő kezelést is kapott. Béta-blokkolóval (metoprolol, propranolol) 36, míg metforminnal 10 beteget kezeltek (ld. 4.3.1 fejezet, 11. táblázat). A párhuzamosan alkalmazott CYP2D6 gátló hatóanyagok módosíthatják az aripiprazol farmakokinetikáját, ezért *CYP2D6* genotípus csoportok szerint vizsgáltuk a risperidon, metoprolol és propranolol, mint potenciális CYP2D6 gátló hatású vegyületek hatását a normalizált aripiprazol szérumszintekre. Az egyes *CYP2D6* genotípusú betegek gyógyszeres terápiájának részleteit a Függelék 26. táblázata tartalmazza. A legalább egy *CYP2D6*1* allélt hordozó betegek esetén risperidon, illetve a béta-blokkoló metoprolol vagy propranolol aripiprazollal történő együttes adása jelentősen befolyásolta az aripiprazol vérszinteket, ellenben a potenciális gátlószer párhuzamos terápiája két *CYP2D6mut* alléllal rendelkezők esetében nem idézett elő változást a vérszintekben (21. ábra). CYP2D6 inhibitor hatására *CYP2D6*1/*1* és *CYP2D6*1/*1xN* genotípusú betegeknél hozzávetőleg 50%-kal ($P < 0,0001$), *CYP2D6*1/mut* genotípusúaknál 20%-kal ($P < 0,05$) magasabbnak adódott az átlagos aripiprazol szérumszint. Ezenkívül a risperidon, metoprolol és propranolol párhuzamos alkalmazása a *CYP2D6* vad allélt hordozó betegeknél megnövelte a kiugróan magas aripiprazol koncentrációk kialakulásának gyakoriságát.



21. ábra. CYP2D6 gátlószeres (risperidon, metoprolol, propranolol) párhuzamos terápiájának hatása az aripiprazol szérumszintekre. A doboz diagramon a medián érték, alsó és felső kvartilisek, illetve a minimum és maximum értékek szerepelnek. A betegek számát (N) jelöltük. *mut*: *CYP2D6*3*, **4*, **5*, **6*, **4xN*, **10* és **41*; *xN*: allél duplikáció; ns: nincs szignifikáns különbség; * $P < 0,05$; ** $P < 0,0001$

A CYP2D6 gátlószerral kezelt betegeknél gyakrabban fordult elő 300 ng/ml-nél magasabb szérum aripiprazol koncentráció a gátlószerral nem kezelt betegekhez viszonyítva (8/37 vs. 2/44; P=0,0378). A két működésképtelen vagy csökkent működőképességű allélt hordozók (*CYP2D6mut/mut*) kivétel nélkül magas aripiprazol vérszintekkel rendelkeztek, függetlenül a párhuzamosan alkalmazott potenciális CYP2D6 inhibitor kezeléstől.

A risperidon és fő metabolitja, a 9-hidroxi-risperidon, a metoprolol, valamint a propranolol aripiprazol metabolizmusára gyakorolt hatását *in vitro* körülmények között, humán máj mikroszóma frakciót felhasználva szintén vizsgáltuk (22. táblázat). A risperidon és a 9-hidroxi-risperidon jelentősen csökkentette a dehidro-aripiprazol és a hidroxi-aripiprazol képződését, és a kompetitív gátlást 8,4 és 13,9 µM közötti K_i értékek jellemezték. A risperidon az aripiprazol N-dealkilációját is gátolta, bár a dehidrogénezéshez és hidroxilezéshez képest egy nagyságrenddel magasabb K_i érték mellett. A risperidonnal szemben a metoprolol és a propranolol kizárólag az aripiprazol dehidrogénezését gátolta kompetitíven, míg nem gátolta a hidroxilációt és az N-dealkilációt. Az inhibíciós konstansok alapján az aripiprazol dehidrogénezés gátlásában számottevő különbséget tapasztaltunk a két béta-blokkoló között, hiszen a propranololra jellemző K_i érték 3,5-szer magasabbnak bizonyult a metoprolol K_i értékénél, ami a metoprolol lényegesen erősebb gátló hatását jelzi.

22. táblázat. Az aripiprazol metabolizmus *in vitro* gátlásának K_i értékei (µM)

	Risperidon	9-Hidroxi-risperidon	Propranolol	Metoprolol
Dehidro-aripiprazol	8,4±2,64	9,3±2,97	48,2±9,16	13,4±2,80
Hidroxi-aripiprazol	9,1±1,70	13,9±0,26	-	-
N-dealkil-aripiprazol	57,0±7,11	-	-	-

Mivel a valproát CYP3A indukáló hatással bír [Zanger és Schwab 2013], ezért szintén hatással lehet az aripiprazol metabolizmusára. Azonban sem az aripiprazol vérszintek, sem a CYP3A4 mRNS szintek nem tértek el a valproát párhuzamos terápia alatt lévő betegeknél a valproátot nem kapó betegekkal összevetve.

6 EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A betegek gyógyszer-metabolizáló képességének eltérései nagymértékben befolyásolhatják egy adott hatóanyag terápiás hatékonyságát és a káros mellékhatások megjelenését, így rendkívül nagy igény van a betegek metabolizáló kapacitását meghatározó tényezők beazonosítására és megismerésére. A személyre szabott gyógyászat kiemelkedő területe a gyógyszeres terápiához a betegek genetikai információit felhasználó farmakogenetika, melynek segítségével viszonylag egyszerű DNS-analízissel juthatnak fontos információhoz a kezelőorvosok. Azonban a genetikai tulajdonságokon felül számos nem-genetikai, endogén illetve környezeti faktor befolyásolja a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő enzimek fenotípusát, expresszióját és működését. Munkánk során a két legnagyobb mértékű polimorfizmussal rendelkező CYP enzim, a CYP2C19 és a CYP2D6 genotípus-alapú fenotípus becslésének lehetőségeit vizsgáltuk *in vitro* rendszerben humán máj mikroszóma frakciót felhasználva, majd a donorok anamnézise alapján igyekeztünk a genotípus-alapú fenotípus becslés ellentmondásait feloldani. Tapasztalatainkat *in vivo* kísérleti körülmények között használtuk fel antipszichotikumokkal kezelt betegeknél. Az antipszichotikum terápia során fellépő hatás-elmaradásnak jelentős következményei vannak, ezenkívül az antipszichotikumok kifejezett mellékhatásainak köszönhetően a betegek kezelőorvossal való együttműködése gyakran sérül, ezért az antipszichotikum kezelés során rendkívül fontos az optimális dózis és a terápiás szérumszint koncentráció mihamarabbi beállítása. Vizsgálatainkba 116 klozapinnal kezelt pszichiátriai beteget vontunk be, ugyanis a klozapin metabolizmusának *in vitro* vizsgálata során a CYP2C19 szerepe, valamint a klozapin vérszint kialakulásában a CYP2C19 genotípus szerepe is felmerült [Linnet és Olesen 1997; Jaquenoud Sirot *et al.* 2009]. Mivel az aripirazol metabolizmusa a CYP2D6 és CYP3A enzimeken keresztül történik [Casey és Canal 2017], ezért a CYP2D6 és CYP3A genotípus, illetve CYP3A4 expresszió és az aripirazol vérszintek kapcsolatát igyekeztünk tisztázni 93 pszichiátriai beteg bevonásával.

6.1 A CYP2C19 genotípus szerepe a fenotípus kialakításában és a klozapin farmakokinetikájában

A CYP2C19 genotípus és fenotípus összefüggéseinek felderítése céljából magyarországi szervdonorok májszövetéből izolált mikroszóma frakció mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitását, mint az egyének CYP2C19 fenotípusát jellemeztük, továbbá SNP genotipizálással meghatároztuk a donorok CYP2C19 genotípusát a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló allélvariánsokra fókuszálva. Az allélvariánsok előfordulási gyakorisága nem tért el

a kaukázusi populációra jellemző gyakoriságtól [Zhou *et al.* 2017], egyszersmind megfelelt a magyar populációról korábban közölt gyakoriságokkal [Rideg *et al.* 2011]. A Rideg és mtsai. által jegyzett tanulmányban a *CYP2C19*2* allélgyakorisága közel azonosnak bizonyult a szervdonoroknál tapasztalt allélgyakorisággal (16,5% vs. 18,4%), ugyanakkor e korábbi tanulmány a *CYP2C19*17* vizsgálatára nem terjedt ki. A *CYP2C19*3* és *CYP2C19*4* allélvariánsokat egyik donor sem hordozta, ami alátámasztja a kaukázusi populációra jellemző 1% alatti előfordulást. A *CYP2C19*17* némileg gyakrabban fordult elő a májszövet donoroknál az irodalomban a kaukázusi populációkban kimutatott gyakorisággal összevetve (26,3% vs. 20-22%) [Zhou *et al.* 2017, Fricke-Galindo *et al.* 2016], azonban ez - tekintettel a viszonylag alacsony mintaszámra – nem feltétlenül jelent szignifikáns eltérést.

A *CYP2C19*2/*2* diplotípust számos *in vivo* tanulmányban összefüggésbe hozták különböző *CYP2C19* szubsztrátok (pl. klopidozgrél, diazepam, omeprazol) csökkent metabolizmusával [Zanger és Schwab 2013; Goldstein 2001], miszerint a homozigóta *CYP2C19*2* diplotípusra jellemző *CYP2C19* enzimhiány mellett kockázatos ezen hatóanyagok alkalmazása. A donorok között csupán egyetlen *CYP2C19*2/*2* genotípussal rendelkező egyén volt, mely bár alacsony mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitást és PM fenotípust mutatott, diplotípus csoportokkal való összehasonlítására nem volt lehetőségünk. A működésképtelen allélvariánst heterozigóta formában hordozók fenotípusa nem volt megbízhatóan becsülhető (13/27). Közülük kilenc donor extenzív, egy ultra-gyors metabolizálónak bizonyult annak ellenére, hogy nem hordozták a fokozott génexpressziót kiváltó -806C>T SNP-t a *CYP2C19* gén promóter régiójában, továbbá anamnézisében nem találtunk olyan hatóanyaggal történő kezelést, amely a CAR/PXR vagy GR szabályzó útvonalon keresztül a *CYP2C19* transzkripció indukcióját idézhette volna elő. A 36 homozigóta vad (*CYP2C19*1/*1*) genotípussal rendelkező donor közül négy UM volt mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitása alapján a genotípusuk szerint becsülhető EM fenotípus helyett. A genotípus alapján a vártnál magasabb *CYP2C19* aktivitás mögött feltehetően olyan hatóanyag jelenléte állhat, amely a nukleáris receptorok aktiválása útján fokozhatta a *CYP2C19* transzkripciót, ellenben nem szerepelt a donorok klinikai anamnézisében.

A vizsgált 114 donor közül 53 mutatott a *CYP2C19* genotípus alapján becsültnél alacsonyabb mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitást, közülük 16 rendkívül alacsony aktivitással bírt, mely PM fenotípust jelent, hasonlóan a két működésképtelen allélvariánst hordozókhöz. Ez a megfigyelés egybecseng korábbi tapasztalatokkal, nevezetesen, hogy egy populációban a PM fenotípussal rendelkezők aránya meghaladja a genotípus alapján várt PM-k arányát (ezzel kapcsolatos összefoglaló közleményt jegyeznek Fricke-Galindo és mtsai [Fricke-Galindo *et al.*

2016]). Mivel számos *in vivo* tanulmány mutatott rá a gyenge metabolizáló fenotípus kockázataira a CYP2C19 szubsztrátok terápiájában (pl. klopidozgrél, omeprazol, citalopram) [Hulot *et al.* 2006; Harada *et al.* 2017; Sofi *et al.* 2011; Furuta *et al.* 2004; Uckun *et al.* 2015; Steimer *et al.* 2005], ezért rendkívül fontos lenne beazonosítani azokat a genotípus és a fenotípus közötti ellentmondások háttérében lévő tényezőket, melyek fenokonverzióhoz, ezáltal átmeneti PM fenotípushoz vezetnek egy vagy több működőképes allél jelenléte ellenére. Ezért a genotípus-alapú fenotípus becslés módszerét kiegészítettük a donorok anamnézisében szereplő olyan nem-genetikai faktorok bevonásával, melyek ismertén befolyásolják a CYP2C19 aktivitását vagy a májfunkciót. CYP2C19 szubsztrát vagy inhibitor terápia csökkentheti a CYP2C19 enzim metabolikus kapacitását, és átmenetileg az egyén PM fenotípusához vezethet, ennél fogva különböző gyógyszer-interakciók forrása lehet [Rost *et al.* 1995; Yucel *et al.* 2016]. A vizsgált szervdonorok közül egy homozigóta vad genotípussal rendelkező donor mefenitoin 4'-hidroxiláz aktivitása alapján IM fenotípust mutatott, azonban klinikai adatai szerint krónikus ranitidin és karbamazepin terápiában részesült. A ranitidin egy H₂-receptor (hisztamin₂-receptor) antagonistája, melyet széleskörben alkalmaznak bél- illetve gyomorfekély kezelésére. Demetilézése elsősorban CYP2C19-, CYP1A2- és CYP2D6-mediálta reakciókban történik [Chung *et al.* 2000]. Bár az antiepileptikum karbamazepin egy jólismert, a CAR/PXR útvonalon keresztül ható induktora számos CYP génnek [Liu *et al.* 2015], Lakehal és mtsai. kimutatták, hogy a karbamazepin és metabolitjai képesek a CYP2C19 szubsztrátok metabolizmusát gátolni [Lakehal *et al.* 2002]. Ugyan a karbamazepin és a ranitidine kompetitív inhibitora a CYP2C19 enzimnek, tehát nem kovalensen kötődnek, a gyenge fenokonverziós hatásban szerepük lehet a mikroszóma preparátumban jelen lévő gátlószereknek. A krónikus alkoholfogyasztás és az amoxicillin/klavulánsav kezelés szintén felelőssé tehető a CYP2C19 fenotípus átmeneti megváltoztatásáért. Az amoxicillin egy antibiotikum, melyet klavulánsavval kombinációban elterjedten alkalmaznak különböző bakteriális fertőzések kezelésére. Mind az etanol, mind az amoxicillin/klavulánsav ismertén hepatotoxikus [Fontana *et al.* 2005; Ersoz *et al.* 2001], azonban ezek CYP aktivitásokra gyakorolt hatásáról keveset tudunk. Eredményeink azt sugallják, hogy az amoxicillin/klavulánsav kezelés, illetve a krónikus alkoholfogyasztás aspecifikus hatása hozzájárulhat a CYP2C19 aktivitás-csökkenéshez, amely végső soron hibás genotípus-alapú fenotípus becsléshez vezet. Krónikus alkoholfogyasztás vagy amoxicillin/klavulánsav terápia 16 donor esetében állt fenn, ezeknél kivétel nélkül a genotípus alapján várhatóan alacsonyabb CYP2C19 aktivitást mértünk, közülük hét donor - az egy, esetleg két vad vagy *CYP2C19*17* allél ellenére - gyenge metabolizálónak bizonyult. Végül a gyulladással járó krónikus

megbetegedések fennállását szintén figyelembe vettük az értékelésben. A gyulladásos folyamatokban felszabaduló faktorok közvetve befolyásolják a májfunkciót, így rendkívül fontos szerepe lehet a CYP fenokonverzió jelenségében [Shah és Smith 2015]. Csökkent CYP expressziót vagy metabolikus kapacitást számos tanulmány hozott kapcsolatba különböző patológiás állapotokkal, így jelentős CYP2C aktivitás-csökkenést találtak előrehaladott daganatos betegségben [Helsby *et al.* 2008], súlyos szívelégtelenségben [Frye *et al.* 2002], epilepsziában [Tóth *et al.* 2015; Monostory *et al.* 2019] illetve májbetegségben [Rost *et al.* 1995; Frye *et al.* 2006] szenvedőknél. Patológiás állapotban a CYP2C19 gén repressziója gyaníthatóan bizonyos gyulladásos citokineknek köszönhető, azonban a folyamat pontos mechanizmusa egyelőre nem ismert [Shah és Smith 2015; Frye *et al.* 2002; Aitken és Morgan 2007]. Az általunk vizsgált donorok közül 7 egyénnél diagnosztizáltak krónikus gyulladással járó betegséget (epilepszia, gasztrointesztinális perforáció, rheumatoid arthritis), közülük kettő mutatott PM fenotípust. Összesen 29 donornál a *CYP2C19* genotípus alapján becsülnél alacsonyabb CYP2C19 aktivitást sem genetikai, sem nem-genetikai tényezővel nem tudtuk alátámasztani. Gyulladással járó kóros elhízás, illetve a lipidek felhalmozódása a májsejtekben szintén kockázati tényezőnek tekinthető a CYP2C19 expresszió és aktivitás megváltoztatásában, azonban a májszövetek hisztopatológiája nem utalt zsírmájra, kivéve egy donort, akinél krónikus alkoholfogyasztás is fennállt. Feltehetően a kórelőzményekből nem ismert, egyéb tényezők is befolyásolhatták a fenotípusos megjelenést. Eredményeink összhangban vannak a Shirashaka és mtsai. közelmúltban megjelent tanulmányával, melyben szintén humán mikroszóma frakciót és mefenitoin próbaszubsztrátot alkalmaztak. Következtetésük szerint a CYP2C19 fenotípus egyéni eltéréseit csak részben támasztja alá a genotípus, azonban nem találtak összefüggéseket a klinikai adatokkal, bár tanulmányukban a kórelőzményekre vonatkozó adatok a donorok jelentős részénél hiányoztak [Shirashaka *et al.* 2016]. Hasonló megállapításra jutottak Gao és mtsai., miszerint a CYP genotípus csak korlátozott információt ad a fenotípusos megjelenésről, ami egyéb fontos tényezőket sejtet az egyéni eltérések hátterében [Gao *et al.* 2016]. Az ellentmondásoknak további forrása lehet a fenotípus kategóriák átfedése. Az általunk EM-nek becsült donorok CYP2C19 aktivitásai nagyon széles tartományban változtak, így az EM és az IM tartományok átfedéséből adódóan további hibásan becsült fenotípusok származhattak.

A *CYP2C19*17* allélt korábban emelkedett CYP2C19 enzimaktivitással hozták összefüggésbe, melyet fokozott génextpresszióknak tulajdonítanak a promóter régióban található SNP-nek köszönhetően [Sim *et al.* 2006], ezért a *CYP2C19*17* allélvariánst hordozók mRNS szintjeit összevetettük a homozigóta vad genotípussal rendelkezők csoportjával. A *CYP2C19*17/*17*

hordozók szignifikánsan magasabb mRNS szintet csak abban az esetben mutattak, amennyiben az összevetésből kizártuk azokat a donorokat, akik anamnézise krónikus alkoholfogyasztást, amoxicillin/klavulánsav terápiát vagy krónikus gyulladást - mint a CYP2C19 expressziót aspecifikusan csökkentő tényezőket - tartalmazott. Az eredmények részben megfelelnek Sanford és mtsai. munkájában közöltekkel, miszerint a *CYP2C19*17/*17* mellett a *CYP2C19*1/*17* diplotípussal rendelkezők is szignifikánsan magasabb génexpressziót mutattak a homozigóta vad mintákhoz képest, azonban a CYP2C19 enzimaktivitások nem tükrözték az emelkedett expressziót [Sanford *et al.* 2013].

Bár a klozapin metabolizmusában elsősorban a CYP1A2 és a CYP3A enzimek vesznek részt, jelen munkában kizárólag a *CYP2C19* genotípus jelentőségére fókuszáltunk, ezért az előbbi enzimek szerepét itt nem fejtem ki. Néhány tanulmány ugyanis felvetette a CYP2C19 enzim szerepét [Linnet és Olesen 1997] és *CYP2C19* genotípus jelentőségét [Jaquenoud Sirot *et al.* 2009] a klozapin lebontásában. Ebből kifolyólag a *CYP2C19* genotípus és mRNS expresszió, valamint a klozapin vérszintek összefüggéseinek tanulmányozásához - mint *in vivo* modell - klozapinnal kezelt pszichiátriai betegek vérmintáit használtuk. A *CYP2C19*17* allélvariáns és a CYP2C19 génexpresszió kapcsolata *in vivo* tökéletesen tükrözte az *in vitro* gyűjtött tapasztalatainkat, miszerint a homozigóta vad mintákkal összevetve szignifikánsan magasabb mRNS szintet csak a *CYP2C19*17/*17* diplotípust hordozók mutattak, míg a heterozigótáknál (*CYP2C19*1/*17*) csak kismértékű emelkedés volt megfigyelhető. Ez a trend a fenotípust tekintve egyértelműen jelzi, hogy a *CYP2C19*17* allélvariáns jelenlétében megnő a kockázata a fokozott expresszió és ultra-gyors metabolizáló képesség kialakulásának, azonban ezt egyéb, nem-genetikai faktorok erősen befolyásolják. A *CYP2C19*1/*1*, *CYP2C19*1/*17* és *CYP2C19*17/*17* diplotípusok mRNS szintjének jelentős átfedése azonban megkérdőjelezi annak az elterjedten alkalmazott becslési eljárásnak a helyességét, miszerint minden *CYP2C19*1/*17* és *CYP2C19*17/*17* genotípust hordozó egyén - egyéb nem-genetikai tényezők figyelembevételével - ultra-gyors metabolizálónak tekintendő.

A klozapin szérumszintje nagymértékben függ a betegek metabolizáló kapacitásától, azonban a klozapin metabolizmusában résztvevő egyes CYP enzimek szerepe egyelőre nem teljesen tisztázott. *In vitro* cDNS-expresszált enzimekkel végzett vizsgálatok a CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6 és CYP2C19 enzimek szerepét vetették fel a klozapin lebontásában [Linnet és Olesen 1997; Olesen és Linnet 2001], ellenben a CYP2D6 és a CYP2C19 részvételét kétségbe vonták a humán mikroszómával végzett kísérletek [Fang *et al.* 1998]. Mindemellett egy *in vivo* tanulmányban összefüggést találtak a *CYP2C19*2/*2* diplotípus és az emelkedett klozapin szintek között [Jaquenoud Sirot *et al.* 2009]. A *CYP2C19* genotípus és a CYP2C19

expresszió alapján azonban nem tudjuk alátámasztani, hogy a CYP2C19-nek bármilyen szerepe lenne a klozapin metabolizmusában és a vérszint kialakulásában. A klozapin dózissal és testtömeggel normalizált vérszintje, illetve a norklozapin/klozapin és a klozapin N-oxid/klozapin vérszint-arányok nem mutattak szignifikáns összefüggést sem az egyes *CYP2C19* diplotípusokkal, sem a CYP2C19 expresszióval. A Jaquenoud Sirot és mtsai. által közöltekkel való ellentmondást egyrészt az magyarázhatja, hogy utóbbi munkában a vérszintek normalizálásánál a betegek testtömegét nem vették figyelembe. Másrészt az *in vitro* és *in vivo* eredményeink alapján megállapítható, hogy a *CYP2C19* genotípus az egyének csak kis része esetén magyarázza a CYP2C19 metabolikus kapacitást, köszönhetően annak, hogy a gén összetett szabályzás alatt áll, így a nem-genetikai és környezeti hatások lényegesen befolyásolják a fenotípusos megjelenést.

6.2 A *CYP2D6* genotípus szerepe a fenotípus kialakításában és az aripiprazol farmakokinetikájában

A CYP2D6 az egyik legfontosabb gyógyszer-metabolizáló CYP enzim, mivel rendkívül sok hatóanyag lebontásában részt vesz. Aktivitásában mutatkozó számottevő egyéni eltéréseknek súlyos következményei lehetnek a betegek gyógyszeres terápiája során. A *CYP2D6* gén szabályzó régiójából hiányoznak azok a többi CYP génre jellemző nukleáris receptor kötő szakaszok (pl. CAR/PXR, GR), amelyek az indukciós mechanizmusban vesznek részt, ennél fogva jelenlegi ismereteink szerint a *CYP2D6* gén expressziója nem indukálható xenobiotikumokkal [Ingelman-Sundberg 2005; Teh és Bertilsson 2012]. Ennek köszönhetően az aktivitásában tapasztalható egyéni eltérések hátterét rendkívüli genetikai polimorfizmusára vezetik vissza, a sok-sok különböző allélvariáns azonban megnehezíti a diplotípusok helyes fenotípusos kategorizálását. Munkánk során humán máj mikroszóma frakció segítségével igyekeztünk felderíteni a *CYP2D6* genotípus és fenotípus közötti kapcsolatokat a kaukázusi populációra jellemző allélvariánsokra fókuszálva. A vizsgált donorok az irodalmi adatokkal megegyező allélgyakoriságokat mutattak, kivéve a génduplikáció előfordulását, mely jelentősen magasabbnak bizonyult mind a kaukázusi [Ingelman-Sundberg 2005; Sachse *et al.* 1997], mind a magyar [Rideg *et al.* 2011] populációról korábban közöltekkel összevetve, azonban ezt nem tudtuk összefüggésbe hozni a betegekről hozzáférhető klinikai adatokkal. A halált legtöbb esetben agyvérzés vagy baleset okozta, sajnos azonban a balesetek körülményeiről csak korlátozott információink voltak: sok esetben autó-, motor- vagy kerékpárbalesetet jegyeztek fel, emellett néhány donor halála fulladás, öngyilkosság illetve

roham következtében következett be. Érdeemes megemlíteni, hogy a génduplikáció gyakorisága nem mutatott különbséget az irodalmi adatokhoz viszonyítva kizárólag a stroke és daganatos betegségek következtében elhunyt donorokat tekintve.

CYP2D6 működésképtelen allélt (nf: *CYP2D6**3, *4, *5, *6) homozigóta formában hordozók és az egy működésképtelen mellett csökkent működőképességű allélvariánst (red: *CYP2D6**10, *41) hordozók *CYP2D6* aktivitásai között különbséget nem tapasztaltunk, egységesen alacsony aktivitás jellemezte a két diplotípus csoportot (*CYP2D6*nf/nf és *CYP2D6*nf/red), ezért megállapíthatjuk, hogy közöttük nem szükséges különbséget tenni kategorizáláskor. Ez azt jelenti, hogy *CYP2D6* szubsztrát terápia esetén mindkét genotípus csoportnál (*CYP2D6*nf/nf és *CYP2D6*nf/red) egységesen javasolható a dózis-csökkentés. Bár mind a *CYP2D6*nf/nf, mind a *CYP2D6*nf/red genotípus kategóriákra a PM mellett IM fenotípus is jellemző volt, ez magyarázható a Hicks és mtsai. [Hicks *et al.* 2014], illetve Gaedigk [Gaedigk 2013] által leírtakkal, miszerint adott genotípus csoport metabolikus aktivitásai sok esetben két fenotípus kategóriát is lefedhetnek. Egy működőképes allél mellett a donorok többnyire a becsült IM aktivitást mutatták. Bár három mintánál EM dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitást tapasztaltunk, amelyek hordozták a korábban fokozott transzkripcióval összefüggésbe hozott -1584C>G SNP-t [Llerena *et al.* 2013; Dorado *et al.* 2009], így az feltehetően szerepet játszott az EM fenotípus kialakításában. A *CYP2D6**1/red diplotípus jellemzően szintén IM kategóriába sorolandó, azonban eredményeink alapján a csökkent működőképességű allélnak köszönhetően kissé magasabb aktivitást mutathatnak, mint a *CYP2D6**1/nf donorok, ezáltal az IM és EM tartományokat átfedő fenotípussal rendelkeztek [Hicks *et al.* 2014; Gaedigk 2013]. A *CYP2D6**1/*1 genotípust hordozók több mint fele a becsült EM kategóriába esett. A két, extrém magas dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitással bíró, homozigóta vad genotípusú donor -1584C>G báziscserét hordozott (egyik homozigóta, másik heterozigóta formában), ami felelőssé tehető az UM fenotípusért. A homozigóta vad genotípusú (*CYP2D6**1/*1) és a duplikációt hordozók (*CYP2D6**1/*1xN) jelentős része a becsült EM és UM fenotípusnál lényegesen alacsonyabb aktivitást mutatott. A donorok anamnézise számos esetben tartalmazott *CYP2D6* aktivitást, illetve a májfunkciót befolyásoló körülményt. Értékelésünkbe – a *CYP2C19*-nél taglaltakhoz hasonlóan – a *CYP2D6* szubsztrát/inhibitor (metoprolol, propranolol, haloperidol) és amoxicillin/klavulánsav terápia, valamint a krónikus alkoholfogyasztás fennállását is bevontuk. Feltehetően a vártnál alacsonyabb *CYP2D6* aktivitás számos esetben tulajdonítható ezen külső faktoroknak, melyek fenokonverziós hatásuknak köszönhetően a becsült extenzív (EM) vagy ultra-gyors metabolizáló (UM) fenotípus helyett intermedier (IM), vagy akár gyenge metabolizáló (PM) fenotípust idéznek elő.

Összefoglalva, a genotípus-alapú fenotípus predikció a donorok mintegy kétharmadánál helyesnek bizonyult. A vártnál némileg magasabb aktivitás, mely a minták 12,5%-ára volt jellemző, származhatott egyrészt a fenotípus kategóriák átfedéséből, másrészt a promóter régióban előforduló -1584C>G SNP expressziót fokozó hatásából, mely bár számos esetben társult extrém magas aktivitással, a teljes populációt tekintve egyértelmű összefüggést nem találtunk a -1584G SNP és fokozott CYP2D6 enzimaktivitás között, így a polimorfizmus pontos szerepének tisztázása további vizsgálatokat igényel. A vizsgált minták több mint egyötöde (20,3%) a becsülnél alacsonyabb CYP2D6 aktivitást mutatott, melynek hátterében állhat az általunk esetleg nem kimutatott polimorf allél jelenléte, hiszen munkánk során csak a kaukázusi populációban leggyakrabban előforduló variánsokra fókuszáltunk, vizsgálatunk egyéb, ritkán előforduló allélvariánsokra nem terjedt ki. Továbbá eredményeink alapján egyértelmű szerep tulajdonítható a CYP2D6 aktivitás meghatározásában olyan külső, nem-genetikai tényezőknek, mint a CYP2D6 szubsztrát/inhibitor terápia, vagy a krónikus alkoholfogyasztás és az amoxicillin/klavulánsav terápia aspecifikus májkárosító hatása. A *CYP2D6* genotípus-alapú fenotípus becslés jelentősen hatékonyabbnak bizonyult a *CYP2C19* esetében tapasztaltakhoz képest (67% vs. 40%), ami magyarázható a két gén eltérő szabályozási mechanizmusával, hiszen míg a *CYP2C19* gén szabályzó régiójában megtalálhatóak az expressziót jelentősen befolyásoló xenobiotikum-érzékeny szakaszok (CAR/PXR, GR), addig a *CYP2D6* szabályzó régiójából ez utóbbiak hiányoznak.

Köszönhetően annak, hogy az aripiprazol metabolizmusában részt vevő enzimekre nagy egyéni variabilitás jellemző, a hatás-elmaradás és a káros mellékhatások elkerülése érdekében ajánlott az aripiprazol vérszintek folyamatos nyomon követése [Kirschbaum *et al.* 2008; Hiemke *et al.* 2018]. Az aripiprazol lebontásáért a CYP2D6 és a CYP3A enzimek tehetők felelőssé. Korábbi munkákban kapcsolatot találtak a *CYP2D6* polimorfizmus és az aripiprazol steady-state szérumszintje között, azonban a *CYP3A* polimorfizmusok szerepe nem bizonyított [Azuma *et al.* 2012; Hendset *et al.* 2007; Suzuki *et al.* 2014]. A *CYP3A5*3* a leggyakrabban előforduló allélvariáns, ami a kaukázusi populációban kb. 90%-ban a *CYP3A5* fehérje hiányához vezet, ezenkívül a *CYP3A4*1B* és *CYP3A4*22* a *CYP3A4* expressziót befolyásoló jelentős polimorf allélok. A genetikai polimorfizmus önmagában azonban nem magyarázza *CYP3A* aktivitásban mutatkozó nagy egyéni eltéréseket. Ezért nem meglepő, hogy kizárólag a *CYP3A* genetikai polimorfizmust vizsgálva nem találtak összefüggést az aripiprazol szérumszintjeivel [van der Weide K és van der Weide J 2015; Belmonte *et al.* 2018], amiből azonban nem lehet a *CYP3A* enzimeknek az aripiprazol metabolizmusában betöltött szerepére vonatkozóan egyértelmű következtetést levonni. A *CYP3A* expressziót jelentősen befolyásolják nem-

genetikai tényezők, így a kor, hormonális állapot, illetve a CYP3A induktorok (pl. karbamazepin, valproát) háttérbe szorítják a genetikai jellemzők expressziót meghatározó hatását [Zanger és Schwab 2013; Spina és de Leon 2014]. Mindazonáltal a CYP3A4 szerepének felderítését célszerűbb a CYP3A4 expresszióval való összefüggések alapján megállapítani. A kutatócsoport korábbi eredményei szerint a fehérvérsejtek CYP3A4 mRNS expressziójának meghatározásával felmért metabolikus kapacitás alkalmas a máj CYP3A4 aktivitásának becslésére különböző CYP3A szubsztrátok esetén (pl. takrolimusz, ciklosporin, klonazepám) [Monostory *et al.* 2015; Tóth *et al.* 2016].

Eredményeink megerősítik azokat a korábbi tapasztalatokat, hogy a *CYP2D6* genotípusnak meghatározó szerepe van az aripiprazol dózissal normalizált vérszintjeire [Suzuki *et al.* 2014; van der Weide K és van der Weide J 2015; Belmonte *et al.* 2018; Hendset *et al.* 2014], bár a genotípus kategóriák között némi átfedés mutatkozott. Az *in vitro* kísérleteinkkel összhangban a *CYP2D6^{nf/nf}* és *CYP2D6^{nf/red}* diplotípusok között különbséget nem tapasztaltunk, holott előbbi rendszerint PM-ként, utóbbit IM-ként kategorizálják [Gaedigk 2013]. A *CYP2D6^{*1/red}* genotípus a *CYP2D6^{*1/nf}* csoporttal megegyező aripiprazol vérszinteket mutatott, továbbá szignifikánsan magasabb vérszinteket a homozigóta vad (*CYP2D6^{*1/*1}*) betegekhez viszonyítva. A duplikáció látszólag nem volt hatással az aripiprazol farmakokinetikájára. Eredményeink megerősítik a Hendset és mtsai. által közöltek, miszerint a *CYP2D6^{red}* allélvariáns jelenléte a *CYP2D6^{nf}* allélekhez hasonló mértékben csökkenti az aripiprazol metabolikus aktivitást [Hendset *et al.* 2013]. A CYP3A státusz (*CYP3A4* és *CYP3A5* genotípus, valamint CYP3A4 expresszió) azonban nem befolyásolta a normalizált aripiprazol szérumszint koncentrációt. A főkomponens analízis eredménye alapján egyértelműen a *CYP2D6* genotípus az aripiprazol elimináció fő meghatározó tényezője, míg a CYP3A aktivitás szerepe elhanyagolható. A dehidro-aripiprazol metabolit képződése szintén *CYP2D6* genotípus-függő volt. A dehidro-aripiprazol koncentráció a *CYP2D6^{*1/*1}* és a *CYP2D6^{*1/*1xN}* diplotípus csoportokban az aripiprazol koncentrációjával összemérhető volt, míg a heterozigóták esetén (*CYP2D6^{*1/mut}*) 35%-át, a polimorf allélra homozigóta (*CYP2D6^{mut/mut}*) betegek esetén mindössze 22%-át tette ki az aripiprazol koncentrációnak. Tehát működésképtelen allélok jelenlétében a magasabb aripiprazol koncentrációt alacsonyabb dehidro-aripiprazol koncentráció kíséri.

Az aripiprazol és dehidro-aripiprazol szérumszint koncentrációk és a *CYP2D6* genotípus szoros összefüggéséből adódóan felvetődik, hogy az aripiprazol farmakokinetikáját erősen befolyásolhatják a *CYP2D6* gátlószerek. A klinikai gyakorlatban gyakran alkalmaznak többkomponensű terápiát pszichiátriai betegségek kezelésére, ezért egyéb

antipszichotikumokkal, antidepresszánsokkal, esetleg - a betegek járulékos betegségeit kezelendő - egyéb hatóanyagokkal történő terápia esetén megnő a gyógyszer-interakció kialakulásának kockázata. Szelektív szerotonin visszavétel gátló hatóanyagokat gyakran alkalmaznak depresszív epizódok kezelésére, melyek közül néhánynak erős CYP2D6 gátló hatása jól ismert (pl. fluoxetin, paroxetin, szertralin, duloxetin). Ezek alkalmazásakor átmenetileg a CYP2D6 szubsztrátok gyenge metabolizmusa alakul ki a vegyületek fenokonverziós hatásának köszönhetően [Patteet *et al.* 2016]. Az aripiprazol clearance jelentős csökkenéséről számoltak be paroxetin vagy fluoxetin párhuzamos terápiája során [Azuma *et al.* 2012; Waade *et al.* 2009], azonban az általunk vizsgált betegcsoportban ezen hatóanyagokat az akathisia kialakulásának fokozott kockázata miatt nem alkalmazták. A vizsgált betegeknek párhuzamosan alkalmazott, potenciális CYP2D6 gátló hatással bíró hatóanyagok között említhetjük a risperidon, metoprolol és propranolol esetleges fenokonverziós hatását [Prakash *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2003; Obach *et al.* 2006; Turpeinen *et al.* 2006]. Megfigyelésünk alapján a risperidon, metoprolol és a propranolol párhuzamos alkalmazása során magasabb aripiprazol szérumban koncentrációk alakultak ki a betegeknek. A risperidon mind a dehidrogenáció, mind a hidroxiláció metabolikus útvonalát gátolta, az inhibíciót jellemző K_i érték hozzávetőleg megegyezett a korábban a CYP2D6-függő bufuralol 1'-hidroxiláció gátlásánál tapasztaltakkal ($6,9 \pm 4,1 \mu\text{M}$) [Prakash *et al.* 2000]. Bár Eap és mtsai. a risperidont *in vivo* gyenge CYP2D6 inhibítorként jellemezték a dextrometorfán O-demetiláz reakció gátlása alapján, a vizsgálatukban részt vevő alanyok a risperidont a klinikai gyakorlatban szokásos dózisonál alacsonyabb dózisban kapták [Eap *et al.* 2001]. A risperidonhoz hasonló mértékű gátlást fejtett ki a dehidrogenációra és hidroxilációra a 9-hidroxi-risperidon, mely a risperidon fő metabolitja. Ez azt jelenti, hogy a risperidon hidroxilációja nem szünteti meg a CYP2D6 gátló hatást. Érdeemes megemlíteni, hogy a 9-hidroxi-risperidon a risperidon farmakológiailag aktív metabolitja, melyet paliperidon néven hoztak forgalomba, ennél fogva feltehetően a paliperidon párhuzamos terápiája szintén az aripiprazol vérszintek emelkedését vonja maga után. A metoprolol és a propranolol egyaránt gátolta az aripiprazol metabolizmust, továbbá a metoprolol gátló hatása jelentősen erősebbnek bizonyult. *In vitro* a metoprolol és a propranolol CYP2D6 gátló hatásának mértékéről hasonló nagyságrendű értékeket közöltek (az IC_{50} értékek 2,5 és 9,8 μM között változtak) különböző CYP2D6 próbaszubsztrátokat (bufuralol, dextrometorfán) alkalmazva [Yamamoto *et al.* 2003; Obach *et al.* 2006; Turpeinen *et al.* 2006]. Habár a metoprolol korábban nem bizonyult a venlafaxin metabolizmus klinikailag jelentős inhibitorának *in vivo* [Hefner *et al.* 2015], Kirschbaum és mtsai. szignifikánsan magasabb aripiprazol koncentrációt találtak a metoprolollal kezelt betegeknek [Kirschbaum *et*

al. 2008], ami egybeesik az általunk tapasztaltakkal. Az *in vitro* gátlásvizsgálatok alapján a metoprolol és a propranolol kizárólag az aktív dehidro-metabolit képződését gátolták, ellenben nem befolyásolták a hidroxiláció és az N-dealkiláció útvonalát. Mivel a hidroxil- és az N-dealkil-származékok inaktív metabolitok, ezért a metoprolol vagy a propranolol párhuzamos alkalmazása az inaktiváció irányába tolhatja el az aripiprazol metabolizmusát, és ez befolyásolhatja az aripiprazol hatékonyságát. Egyéb második generációs antipszichotikumokkal összevetve az aripiprazol terápia alatt magasabb az akathisia kialakulásának kockázata [Thomas *et al.* 2015]. A klinikai gyakorlatban az akathisia kezelésére gyakran metoprololt, illetve propranololt alkalmaznak [Miller és Fleischhacker 2000], melynek következtében - eredményeink alapján - a kiugróan magas (>300 ng/ml) aripiprazol szint kialakulásának valószínűsége megnő. A 300 ng/ml szérumban aripiprazol koncentrációt meghaladó vérszintek esetén a közepesen súlyos és súlyos mellékhatások kialakulásának fokozott kockázata van [Kirschbaum *et al.* 2008]. A CYP2D6 genotípus és a párhuzamosan alkalmazott hatóanyagokra vonatkozó megállapításainkat figyelembe véve javulhat az aripiprazol biztonságos klinikai alkalmazása.

7 TÉZISPONTOK

1. A CYP genotípus-fenotípus összefüggések *in vitro* vizsgálata során igazoltuk, hogy a *CYP2C19* és *CYP2D6* genotípus csak részben határozza meg az egyének fenotípusát. A *CYP2C19* fenotípus becslés hatékonysága jelentősen elmaradt a *CYP2D6* becslés során tapasztaltaktól, mely feltehetően a *CYP2C19* gén szabályozó régiójában található xenobiotikum-érzékeny szakaszoknak köszönhető, mivel ezek a *CYP2D6* transzkripció szabályzásában nem vesznek részt. Ezenkívül olyan külső, nem-genetikai tényezők, mint a krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin/klavulánsav terápia, *CYP2C19* illetve *CYP2D6* szubsztrát/inhibitor terápia vagy gyulladással járó krónikus megbetegedés, képesek lehetnek a *CYP2C19* és *CYP2D6* metabolikus kapacitás megváltoztatására, így téves genotípus-alapú fenotípus becsléshez vezethetnek.
2. Mind az *in vitro*, mind a pszichiátriai betegeken végzett *in vivo* vizsgálatok tapasztalatai azt mutatják, hogy a *CYP2C19**17/*17 diplotípust hordozó egyéneknél magasabb a kockázata a fokozott génexpresszió és a *CYP2C19* ultra-gyors metabolizáló fenotípus kialakulásának, azonban nem-genetikai tényezők erősen befolyásolhatják a *CYP2C19* fenotípust, és módosíthatják a metabolikus kapacitást.
3. Igazoltuk, hogy a klozapin metabolizmusában *in vivo* sem a *CYP2C19* genotípusnak, sem a *CYP2C19* expresszióknak nincsen számottevő szerepe, ezáltal a *CYP2C19*-státusz jelentősége a klozapin klinikai alkalmazásában elhanyagolható.
4. Klinikai vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az aripiprazol steady-state szérumszintjeit és a dehidro-aripiprazol képződését elsősorban a *CYP2D6* genotípus határozza meg, míg a CYP3A enzimek hozzájárulása az *in vivo* aripiprazol clearance-hez nem számottevő. Továbbá megállapítottuk, hogy a risperidon, metoprolol vagy propranolol, mint *CYP2D6* inhibitorok párhuzamos alkalmazása módosítja az aripiprazol expozíciót a *CYP2D6* vad típusú allélt hordozó betegeknél.
Eredményeink azt jelzik, hogy a betegek *CYP2D6* genotípusa és a *CYP2D6* inhibitorok párhuzamos alkalmazása tekinthető a legfontosabb tényezőnek az aripiprazol farmakokinetikai viselkedésében. Azonban további *in vivo* vizsgálatok szükségesek annak megválaszolásához, hogy a *CYP2D6* genotípus és a *CYP2D6* inhibitor komedikáció figyelembevételével javítható-e az aripiprazol terápia kimenetele.

8 KIVONAT

Az egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség becslésével lehetővé válik a betegek személyre szabott terápiája, mellyel mérsékelhetjük a káros mellékhatások kialakulásának kockázatát. A citokróm P450 (CYP) enzimek változatos reakciókban alakítják át a gyógyszervegyületeket. A CYP aktivitásokat rendkívül nagy egyéni eltérések jellemzik, melyek részben a CYP gének polimorfizmusából erednek. Két jelentős genetikai polimorfizmussal rendelkező CYP enzim a CYP2C19 és a CYP2D6. Míg a *CYP2C19* gén transzkripciója xenobiotikumok által indukálható, addig a *CYP2D6* gént konstitutív expresszió jellemzi. Munkánk során a CYP2C19 és a CYP2D6 genotípus-alapú fenotípus becslés lehetőségét vizsgáltuk *in vitro*, továbbá kerestük azokat a nem-genetikai tényezőket, melyek módosíthatják a fenotípust. Tapasztalatainkat két antipszichotikum, a klozapin és az aripiprazol metabolizmusának tisztázására használtuk fel *in vivo*, pszichiátriai betegek bevonásával.

Meghatároztuk 114 szervdonor CYP2C19-specifikus mefenitoin 4'-hidroxiláz, valamint 128 szervdonor CYP2D6-specifikus dextrometorfán *O*-demetiláz aktivitását humán máj mikroszóma frakció felhasználásával. A szövet-donorok genotípusának meghatározásánál a *CYP2C19**2, *3, *4, *17 illetve *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *10, *41 allélvariánsokra fókuszáltunk, az allélvariánsokra jellemző SNP-k kimutatását real-time PCR technikával végeztük. A fenotípust befolyásoló nem-genetikai tényezők beazonosításához a szervdonorok anamnézisének tekintettük át. Az *in vivo* vizsgálatokba klozapinnal (N=116) és aripiprazollal (N=93) kezelt pszichiátriai betegeket vontunk be. Meghatároztuk a klozapinnal kezelt betegek *CYP2C19* genotípusát és expresszióját, valamint az aripiprazollal kezelt betegek *CYP2D6*, *CYP3A* genotípusát és *CYP3A4* expresszióját. Ezenkívül mértük a klozapin, norklozapin és klozapin N-oxid, valamint az aripiprazol és dehidro-aripiprazol szérumszinteket, majd összefüggéseket kerestünk a genotípus és a vérszintek között.

Jelentősen hatékonyabbnak bizonyult a *CYP2D6* genotípus-alapú fenotípus becslés a *CYP2C19* esetében tapasztaltaknál, melynek háttérében eltérő szabályozó mechanizmusuk állhat. Megállapításaink alapján a krónikus alkoholfogyasztás és megbetegedés, az amoxicillin/klavulánsav illetve a CYP inhibitor terápia a fenotípus megváltozását idézhetik elő. Megállapítottuk, hogy a *CYP2C19**17 allélvariáns emelkedett *CYP2C19* expresszióhoz vezethet. A *CYP2C19* genotípus és a *CYP2C19* expresszió nem befolyásolja a klozapin metabolizmusát, míg az aripiprazol metabolizmusát a *CYP2D6* genotípus és a *CYP2D6* gátlószerek párhuzamos terápiája határozza meg, és a *CYP3A4* és a *CYP3A5* szerepe elhanyagolható.

9 ABSTRACT

Prediction of patients' drug metabolizing capacity may improve the personalized medication, avoiding adverse drug reactions. The most important Phase I drug metabolizing enzymes are cytochrome P450s (CYPs). CYP activities show enormous inter-individual differences, which at least partially originates from genetic polymorphism. *CYP2C19* and *CYP2D6* are highly polymorphic genes. *CYP2C19* gene expression is inducible *via* xenobiotic activated nuclear receptors, whereas xenobiotics are not able to increase *CYP2D6* transcription. In the present work, the *CYP2C19/CYP2D6* genotype-based phenotype prediction was investigated using *in vitro* hepatic microsomal system, and non-genetic factors evoking phenoconversion were attempted to identify. Our further aim was to clarify the role of *CYP2C19* genotype and expression in clozapine metabolism, and the role of *CYP2D6* and *CYP3A* genotypes and *CYP3A4* expression in aripiprazole metabolism *in vivo*.

CYP2C19-selective mephenytoin 4'-hydroxylase activity and *CYP2D6*-selective dextromethorphan O-demethylase activity were measured in human liver microsomes isolated from 114 and 128 Hungarian organ donors, respectively. Tissue-donors were genotyped by identification of *CYP2C19**2, *3, *4, *17 and *CYP2D6**3, *4, *5, *6, *10, *41 allele variants using real-time PCR method. Non-genetic factors, that might have phenoconversion potency, were identified by reviewing the clinical history of the donors. Patients treated with clozapine (N=116) and aripiprazole (N=93) were enrolled in our *in vivo* trial. *CYP2C19* genotype and expression in patients treated with clozapine as well as *CYP2D6* and *CYP3A* genotypes and *CYP3A4* expression in patients treated with aripiprazole were determined. Serum concentrations of clozapine, norclozapine and clozapine N-oxide as well as aripiprazole and dehydroaripiprazole were measured by LC-MS/MS. Our aim was to investigate 1) the role of *CYP2C19* in clozapine metabolism and 2) the role *CYP2D6* and *CYP3A* in aripiprazole metabolism.

Phenotype prediction from *CYP2D6* genotype data was more reliable comparing to *CYP2C19*, which could be partly explained by the differences between the transcriptional regulation of the two genes. Our results suggest that chronic alcohol consumption, chronic diseases, co-medication with *CYP2C19/CYP2D6* inhibitors and amoxicillin/clavulanic acid therapy could lead to genotype-phenotype mismatches. *CYP2C19**17 variant was associated with higher *CYP2C19* expression. Finally, we concluded, that neither *CYP2C19* genotype nor *CYP2C19* expression influenced clozapine metabolism, whereas *CYP2D6* genotype and co-medication with *CYP2D6* inhibitors are the most important factors in aripiprazole pharmacokinetics, and the significance of *CYP3A4* and *CYP3A5* is negligible.

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Monostory Katalin áldozatos munkáját, ötleteit, és hogy folyamatosan segítette munkámat tanácsaival.

Szeretném megköszönni a Szerkezeti biokémia program jelenlegi és volt vezetőjének, Dr. Kovács Mihálynak és Dr. Nyitrai Lászlónak, hogy a program keretében lehetőséget biztosítottak kutatásaim elvégzésére.

Köszönöm Dr. Szabó Pálnak és Sirok Dávidnak a tömegspektrometriás mérésekben, valamint Ales Belic-nek a statisztikai értékelésben nyújtott segítségét.

Köszönöttem tartozom professzor Bitter Istvánnak és Dr. Csukly Gábornak a klinikai vizsgálatokkal kapcsolatban nyújtott szakmai segítségért.

Köszönöm a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak, különösen Dr. Tóth Katalinnak és Déri Máténak, hogy segítettek tanácsaikkal, ötleteikkel, és biztosították a jó hangulatot a közös munkával eltöltött mindennapokban.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak, hogy támogatták munkámat, különösen feleségemnek, aki áldozatos helytállásával biztosította a háttér munkám elvégzéséhez, illetve édesanyámnak, akinek támogatása nélkül doktori tanulmányaim nem valósulhattak volna meg.

11 IRODALOMJEGYZÉK

- Aitken AE, Morgan ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35(9):1687-93.
- Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen.* 2003; 42(4):299-305.
- Ayano G. Schizophrenia: A Concise Overview of Etiology, Epidemiology Diagnosis and Management: Review of literatures. *J Schizophr Res.* 2016; 3(2):1026.
- Azuma J, Hasunuma T, Kubo M, Miyatake M, Koue T, Higashi K, Fujiwara T, Kitahara S, Katano T, Hara S. The relationship between clinical pharmacokinetics of aripiprazole and CYP2D6 genetic polymorphism: effects of CYP enzyme inhibition by coadministration of paroxetine or fluvoxamine. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(1):29-37.
- Bachmann CJ, Rieger-Gies A, Heinzl-Gutenbrunner M, Hiemke C, Renschmidt H, Theisen FM. Large variability of aripiprazole and dehydroaripiprazole serum concentrations in adolescent patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit.* 2008; 30(4):462-6.
- Backman JT, Filppula AM, Niemi M, Neuvonen PJ. Role of Cytochrome P450 2C8 in Drug Metabolism and Interactions. *Pharmacol Rev.* 2016; 68(1):168-241.
- Bahar MA, Setiawan D, Hak E, Wilffert B. Pharmacogenetics of drug-drug interaction and drug-drug-gene interaction: a systematic review on CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. *Pharmacogenomics.* 2017; 18(7):701-739.
- Barclay ML, Sawyers SM, Begg EJ, Zhang M, Roberts RL, Kennedy MA, Elliott JM. Correlation of CYP2D6 genotype with perhexiline phenotypic metabolizer status. *Pharmacogenetics.* 2003; 13(10):627-32.
- Belmonte C, Ochoa D, Román M, Saiz-Rodríguez M, Wojnicz A, Gómez-Sánchez CI, Martín-Vílchez S, Abad-Santos F. Influence of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 Polymorphisms on Pharmacokinetics and Safety of Aripiprazole in Healthy Volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018; 122(6):596-605.
- Brown AS. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol.* 2012; 72(10):1272-6.
- Casey AB, Canal CE. Classics in Chemical Neuroscience: Aripiprazole. *ACS Chem Neurosci.* 2017; 8(6):1135-1146.
- Chen Y, Goldstein JA. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab.* 2009; 10(6):567-78.
- Chung WG, Park CS, Roh HK, Lee WK, Cha YN. Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn J Pharmacol.* 2000; 84(2):213-20.

Coleman MD. Cytochrome P450 Inhibition. *Human Drug Metabolism*, John Wiley & Sons, Ltd. 2010; Chapter 5:93-123.

Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet*. 2006; 45(1):13-31.

Day RO, Snowden L, McLachlan AJ. Life-threatening drug interactions: what the physician needs to know. *Intern Med J*. 2017; 47(5):501-512.

Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet*. 2002; 41(12):913-58.

Dorado P, Peñas-Lledó EM, de la Rubia A, Llerena A. Relevance of CYP2D6 -1584C>G polymorphism for thioridazine:mesoridazine plasma concentration ratio in psychiatric patients. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(7):1083-9.

Döring B, Petzinger E. Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev*. 2014; 46(3):261-82.

Dutheil F, Beaune P, Lorient MA. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*. 2008; 90(3):426-36.

Eap CB, Bondolfi G, Zullino D, Bryois C, Fuciec M, Savary L, Jonzier-Perey M, Baumann P. Pharmacokinetic drug interaction potential of risperidone with cytochrome p450 isozymes as assessed by the dextromethorphan, the caffeine, and the mephenytoin test. *Ther Drug Monit*. 2001; 23(3):228-31.

EMMI. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma szakmai irányelve a bipoláris affektív betegségek diagnosztikájáról és terápiájáról. *Egészségügyi Közlöny*, EMMI. 2016; LXV. évfolyam.

Ersoz G, Karasu Z, Yildiz C, Akarca US, Yuce G, Batur Y. Severe toxic hepatitis associated with amoxicillin and clavulanic acid. *J Clin Pharm Ther*. 2001; 26(3):225-9.

Evensen S, Wisløff T, Lystad JU, Bull H, Ueland T, Falkum E. Prevalence, Employment Rate, and Cost of Schizophrenia in a High-Income Welfare Society: A Population-Based Study Using Comprehensive Health and Welfare Registers. *Schizophr Bull*. 2016; 42(2):476-83.

Fang J, Coutts RT, McKenna KF, Baker GB. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998; 358(5):592-9.

Fekete S, Herold R, Tényi T, Trixler M. Skizofrénia szakmai protokoll. *Pszichiátriai útmutató*. 2010.

Fontana RJ, Shakil AO, Greenson JK, Boyd I, Lee WM. Acute liver failure due to amoxicillin and amoxicillin/clavulanate. *Dig Dis Sci*. 2005; 50(10):1785-90.

Fricke-Galindo I, Céspedes-Garro C, Rodrigues-Soares F, Naranjo ME, Delgado Á, de Andrés F, López-López M, Peñas-Lledó E, Llerena A. Interethnic variation of CYP2C19 alleles,

'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics J.* 2016; 16(2):113-23.

Frueh FW, Amur S, Mummaneni P, Epstein RS, Aubert RE, DeLuca TM, Verbrugge RR, Burckart GJ, Lesko LJ. Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by the United States food and drug administration: prevalence of related drug use. *Pharmacotherapy.* 2008; 28(8):992-8.

Frye RF, Schneider VM, Frye CS, Feldman AM. Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* 2002; 8(5):315-9.

Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, Branch RA. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80(3):235-45.

Fukuda T, Nishida Y, Imaoka S, Hiroi T, Naohara M, Funae Y, Azuma J. The decreased in vivo clearance of CYP2D6 substrates by CYP2D6*10 might be caused not only by the low-expression but also by low affinity of CYP2D6. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 380(2):303-8.

Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics.* 2004; 5(2):181-202.

Gaedigk A, Ndjountché L, Divakaran K, Dianne Bradford L, Zineh I, Oberlander TF, Brousseau DC, McCarver DG, Johnson JA, Alander SW, Wayne Riggs K, Steven Leeder J. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther.* 2007; 81(2):242-51.

Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83(2):234-42.

Gaedigk A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation. *Int Rev Psychiatry.* 2013; 25(5):534-53.

Gao N, Tian X, Fang Y, Zhou J, Zhang H, Wen Q, Jia L, Gao J, Sun B, Wei J, Zhang Y, Cui M, Qiao H. Gene polymorphisms and contents of cytochrome P450s have only limited effects on metabolic activities in human liver microsomes. *Eur J Pharm Sci.* 2016; 92:86-97.

Ghassabian S, Chetty M, Tattam BN, Glen J, Rahme J, Stankovic Z, Ramzan I, Murray M, McLachlan AJ. The participation of cytochrome P450 3A4 in clozapine biotransformation is detected in people with schizophrenia by high-throughput in vivo phenotyping. *J Clin Psychopharmacol.* 2010; 30(5):629-31.

Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 52(4):349-55.

Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet.* 2016; 387(10027):1561-72.

Gründer G, Fellows C, Janouschek H, Veselinovic T, Boy C, Bröcheler A, Kirschbaum KM, Hellmann S, Spreckelmeyer KM, Hiemke C, Rösch F, Schaefer WM, Vernaleken I. Brain and

plasma pharmacokinetics of aripiprazole in patients with schizophrenia: an [¹⁸F]fallypride PET study. *Am J Psychiatry*. 2008; 165(8):988-95.

Ha-Duong NT, Dijols S, Macherey AC, Goldstein JA, Dansette PM, Mansuy D. Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of human cytochrome P450 2C19. *Biochemistry*. 2001; 40(40):12112-22.

Harada S, Zhou Y, Duncan S, Armstead AR, Coshatt GM, Dillon C, Brott BC, Willig J, Alsip JA, Hillegass WB, Limdi NA. Precision Medicine at the University of Alabama at Birmingham: Laying the Foundational Processes Through Implementation of Genotype-Guided Antiplatelet Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 102(3):493-501.

He P, Court MH, Greenblatt DJ, von Moltke LL. Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34(7):1198-207.

He ZX, Chen XW, Zhou ZW, Zhou SF. Impact of physiological, pathological and environmental factors on the expression and activity of human cytochrome P450 2D6 and implications in precision medicine. *Drug Metab Rev*. 2015; 47(4):470-519.

Hefner G, Unterecker S, Shams ME, Wolf M, Falter T, Haen E, Hiemke C. Melperone but not bisoprolol or metoprolol is a clinically relevant inhibitor of CYP2D6: evidence from a therapeutic drug monitoring survey. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015; 122(11):1609-17.

Helsby NA, Lo WY, Sharples K, Riley G, Murray M, Spells K, Dzhelai M, Simpson A, Findlay M. CYP2C19 pharmacogenetics in advanced cancer: compromised function independent of genotype. *Br J Cancer*. 2008; 99(8):1251-5.

Henderson DC, Cagliero E, Gray C, Nasrallah RA, Hayden DL, Schoenfeld DA, Goff DC. Clozapine, diabetes mellitus, weight gain, and lipid abnormalities: A five-year naturalistic study. *Am J Psychiatry*. 2000; 157(6):975-81.

Hendset M, Hermann M, Lunde H, Refsum H, Molden E. Impact of the CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007; 63(12):1147-51.

Hendset M, Molden E, Knape M, Hermann M. Serum concentrations of risperidone and aripiprazole in subgroups encoding CYP2D6 intermediate metabolizer phenotype. *Ther Drug Monit*. 2014; 36(1):80-5.

Hicks JK, Swen JJ, Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr Drug Metab*. 2014; 15(2):218-32.

Hicks JK, Swen JJ, Thorn CF, Sangkuhl K, Kharasch ED, Ellingrod VL, Skaar TC, Müller DJ, Gaedigk A, Stingl JC; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clin Pharmacol Ther*. 2013; 93(5):402-8.

Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschgler R, Zernig G,

- Zurek G, Baumann P. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*. 2018; 51(1-02):9-62.
- Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*. 2006; 108(7):2244-7.
- Ingelman-Sundberg M, Persson A, Jukic MM. Polymorphic expression of CYP2C19 and CYP2D6 in the developing and adult human brain causing variability in cognition, risk for depression and suicide: the search for the endogenous substrates. *Pharmacogenomics*. 2014; 15(15):1841-4.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*. 2007; 116(3):496-526.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396(1):90-4.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005; 5(1):6-13.
- Iqbal MM, Rahman A, Husain Z, Mahmud SZ, Ryan WG, Feldman JM. Clozapine: a clinical review of adverse effects and management. *Ann Clin Psychiatry*. 2003; 15(1):33-48.
- Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S, Oneda B, Crettol S, Ansermot N, Baumann P, Eap CB. ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *J Clin Psychopharmacol*. 2009; 29(4):319-26.
- Johansson I, Ingelman-Sundberg M. CNVs of human genes and their implication in pharmacogenetics. *Cytogenet Genome Res*. 2008; 123(1-4):195-204.
- Jones AE, Brown KC, Werner RE, Gotzkowsky K, Gaedigk A, Blake M, Hein DW, van der Horst C, Kashuba AD. Variability in drug metabolizing enzyme activity in HIV-infected patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010; 66(5):475-85.
- Joseph PD, Guengerich PF, Miners JO. "Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev*. 2005; 37(4):575-80.
- Kerpel-Fronius S, Lóránt M. A new atypical antipsychotic with partial dopamine agonist effect (aripiprazole). *Neuropsychopharmacol Hung*. 2004; 6(4):177-84.
- Kirschbaum KM, Müller MJ, Malevani J, Mobascher A, Burchardt C, Piel M, Hiemke C. Serum levels of aripiprazole and dehydroaripiprazole, clinical response and side effects. *World J Biol Psychiatry*. 2008; 9(3):212-8.
- Kovacs G. Pharmacotherapy of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Hung*. 2011; 13(4):239-47.

- Kronbach T, Mathys D, Gut J, Catin T, Meyer UA. High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):24-32.
- Küpfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984; 26(6):753-9.
- Lakehal F, Wurden CJ, Kalhorn TF, Levy RH. Carbamazepine and oxcarbazepine decrease phenytoin metabolism through inhibition of CYP2C19. *Epilepsy Res.* 2002; 52(2):79-83.
- Lamba V, Panetta JC, Strom S, Schuetz EG. Genetic predictors of interindividual variability in hepatic CYP3A4 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332(3):1088-99.
- Lameh J, Burstein ES, Taylor E, Weiner DM, Vanover KE, Bonhaus DW. Pharmacology of N-desmethylclozapine. *Pharmacol Ther.* 2007; 115(2):223-31.
- Lee ST, Ryu S, Kim SR, Kim MJ, Kim S, Kim JW, Lee SY, Hong KS. Association study of 27 annotated genes for clozapine pharmacogenetics: validation of preexisting studies and identification of a new candidate gene, ABCB1, for treatment response. *J Clin Psychopharmacol.* 2012; 32(4):441-8.
- Lehman AF, Lieberman JA, Dixon LB, McGlashan TH, Miller AL, Perkins DO, Kreyenbuhl J; American Psychiatric Association; Steering Committee on Practice Guidelines. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia, second edition. *Am J Psychiatry.* 2004; 161(2 Suppl):1-56.
- Lerner V, Libov I, Kotler M, Strous RD. Combination of "atypical" antipsychotic medication in the management of treatment-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28(1):89-98.
- Linnet K, Olesen OV. Metabolism of clozapine by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25(12):1379-82.
- Liu A, Wang C, Hehir M, Zhou T, Yang J. In vivo induction of CYP in mice by carbamazepine is independent on PXR. *Pharmacol Rep.* 2015; 67(2):299-304.
- Li-Wan-Po A, Girard T, Farndon P, Cooley C, Lithgow J. Pharmacogenetics of CYP2C19: functional and clinical implications of a new variant CYP2C19*17. *Br J Clin Pharmacol.* 2010; 69(3):222-30.
- Llerena A, Dorado P, Ramírez R, Calzadilla LR, Peñas-Lledó E, Álvarez M, Naranjo ME, González I, Pérez B; CEIBA Consortium of Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF. CYP2D6 -1584C>G promoter polymorphism and debrisoquine ultrarapid hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenomics.* 2013; 14(16):1973-7.
- Lolodi O, Wang YM, Wright WC, Chen T. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery. *Curr Drug Metab.* 2017; 18(12):1095-1105.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.

- Mallikaarjun S, Salazar DE, Bramer SL. Pharmacokinetics, tolerability, and safety of aripiprazole following multiple oral dosing in normal healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2004; 44(2):179-87.
- Matsunaga N, Inoue M, Kusunose N, Kakimoto K, Hamamura K, Hanada Y, Toi A, Yoshiyama Y, Sato F, Fujimoto K, Koyanagi S, Ohdo S. Time-dependent interaction between differentiated embryo chondrocyte-2 and CCAAT/enhancer-binding protein α underlies the circadian expression of CYP2D6 in serum-shocked HepG2 cells. *Mol Pharmacol*. 2012; 81(5):739-47.
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev*. 2008; 30:67-76.
- McGrath JJ, Eyles DW, Pedersen CB, Anderson C, Ko P, Burne TH, Norgaard-Pedersen B, Hougaard DM, Mortensen PB. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case-control study. *Arch Gen Psychiatry*. 2010; 67(9):889-94.
- Meli G, Ottl B, Paladini A, Cataldi L. Prenatal and perinatal risk factors of schizophrenia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25(12):2559-63.
- Miller CH, Fleischhacker WW. Managing antipsychotic-induced acute and chronic akathisia. *Drug Saf*. 2000 Jan;22(1):73-81.
- Monostory K, Tóth K, Kiss Á, Háfra E, Csikány N, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L. Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 80(6):1429-37.
- Monostory K, Nagy A, Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Déri M, Csukly G. Relevance of CYP2C9 Function in Valproate Therapy. *Curr Neuropharmacol*. 2019; 17(1):99-106.
- Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, Sinal CJ. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos*. 2008; 36(2):205-16.
- National Collaborating Centre for Mental Health (UK). Schizophrenia: Core Interventions in the Treatment and Management of Schizophrenia in Primary and Secondary Care. Leicester (UK): *British Psychological Society*; 2009.
- Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*. 2002; 360(9340):1155-62.
- Nielsen J, Foldager L, Meyer JM. Increased use of antibiotics in patients treated with clozapine. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009; 19(7):483-6.
- Niwa T, Shizuku M, Yamano K. Effect of genetic polymorphism on the inhibition of dopamine formation from p-tyramine catalyzed by brain cytochrome P450 2D6. *Arch Biochem Biophys*. 2017; 620:23-27.
- Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316(1):336-48.

- Olesen OV, Linnet K. Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations. *J Clin Pharmacol*. 2001; 41(8):823-32.
- Olfson M, Marcus SC, Wan GJ. Treatment patterns for schizoaffective disorder and schizophrenia among Medicaid patients. *Psychiatr Serv*. 2009; 60(2):210-6.
- Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. *Abilify Prescribing Information*. 2014.
- Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet*. 2016; 388(10039):86-97.
- Pan X, Ning M, Jeong H. Transcriptional Regulation of CYP2D6 Expression. *Drug Metab Dispos*. 2017; 45(1):42-48.
- Parkinson A, Ogilvie BW, Buckley DB, Kazmi F, Czerwinski M, Parkinson O. Biotransformation of xenobiotics. *Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, Eighth edition*, (Szerkesztette Curtis Klaassen). 2013; Chapter 6:133-224.
- Patteet L, Haufroid V, Maudens K, Sabbe B, Morrens M, Neels H. Genotype and co-medication dependent CYP2D6 metabolic activity: effects on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, risperidone, paliperidone and zuclopenthixol. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016; 72(2):175-84.
- Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab*. 2008; 9(2):129-43.
- Pedersen RS, Brasch-Andersen C, Sim SC, Bergmann TK, Halling J, Petersen MS, Weihe P, Edvardsen H, Kristensen VN, Brøsen K, Ingelman-Sundberg M. Linkage disequilibrium between the CYP2C19*17 allele and wildtype CYP2C8 and CYP2C9 alleles: identification of CYP2C haplotypes in healthy Nordic populations. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010; 66(12):1199-205.
- Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsä E, Pirkola S, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, Hintikka J, Kieseppä T, Härkänen T, Koskinen S, Lönnqvist J. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64(1):19-28.
- Perera MA. The missing linkage: what pharmacogenetic associations are left to find in CYP3A? *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010; 6(1):17-28.
- Prakash C, Kamel A, Cui D, Whalen RD, Miceli JJ, Tweedie D. Identification of the major human liver cytochrome P450 isoform(s) responsible for the formation of the primary metabolites of ziprasidone and prediction of possible drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2000; 49 Suppl 1:35S-42S.
- Prakash C, Zuniga B, Song CS, Jiang S, Cropper J, Park S, Chatterjee B. Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. *Nucl Receptor Res*. 2015; 2. pii: 101178.
- Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*. 1997; 29(1-2):413-580.

Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002; 34(1-2):83-448.

Rideg O, Háber A, Botz L, Szücs F, Várnai R, Miseta A, Kovács GL. Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant CYP2D6, CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms in the Hungarian population. *Cell Biochem Funct.* 2011; 29(7):562-8.

Rihmer Z, Gonda X, Rihmer A, Döme P. Antidepressant-resistant depression and the bipolar spectrum - diagnostic and therapeutic considerations. *Psychiatr Hung.* 2016; 31(2):157-68.

Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene.* 2006; 25(11):1679-91.

Rodríguez-Antona C, Sayi JG, Gustafsson LL, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. Phenotype-genotype variability in the human CYP3A locus as assessed by the probe drug quinine and analyses of variant CYP3A4 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338(1):299-305.

Rost KL, Brockmöller J, Esdorn F, Roots I. Phenocopies of poor metabolizers of omeprazole caused by liver disease and drug treatment. *J Hepatol.* 1995; 23(3):268-77.

Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997 Feb;60(2):284-95.

Sadee W. The relevance of "missing heritability" in pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92(4):428-30.

Sanford JC, Guo Y, Sadee W, Wang D. Regulatory polymorphisms in CYP2C19 affecting hepatic expression. *Drug Metabol Drug Interact.* 2013; 28(1):23-30.

Schaber G, Wiatr G, Wachsmuth H, Dachtler M, Albert K, Gaertner I, Breyer-Pfaff U. Isolation and identification of clozapine metabolites in patient urine. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(6):923-31.

Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res.* 2004; 50(2):195-200.

Selten JP, Cantor-Graae E, Kahn RS. Migration and schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry.* 2007; 20(2):111-5.

Shah RR, Smith RL. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 79(2):222-40.

Shah RR, Smith RL. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos.* 2015; 43(3):400-10.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and

toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270(1):414-23.

Shirasaka Y, Chaudhry AS, McDonald M, Prasad B, Wong T, Calamia JC, Fohner A, Thornton TA, Isoherranen N, Unadkat JD, Rettie AE, Schuetz EG, Thummel KE. Interindividual variability of CYP2C19-catalyzed drug metabolism due to differences in gene diplotypes and cytochrome P450 oxidoreductase content. *Pharmacogenomics J.* 2016; 16(4):375-87.

Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 79(1):103-13.

Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2011; 11(3):199-206.

Spina E, de Leon J. Clinically relevant interactions between newer antidepressants and second-generation antipsychotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10(5):721-46.

Srivastava PK, Yun CH, Beaune PH, Ged C, Guengerich FP. Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol Pharmacol.* 1991; 40(1):69-79.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or not, that is the question: pharmacogenetic testing of CYP2D6 and CYP2C19 identifies patients with low or high risk for side effects in amitriptyline therapy. *Clin Chem.* 2005; 51(2):376-85.

Stingl JC, Esslinger C, Tost H, Bilek E, Kirsch P, Ohmle B, Viviani R, Walter H, Rietschel M, Meyer-Lindenberg A. Genetic variation in CYP2D6 impacts neural activation during cognitive tasks in humans. *Neuroimage.* 2012; 59(3):2818-23.

Suzuki T, Mihara K, Nakamura A, Kagawa S, Nagai G, Nemoto K, Kondo T. Effects of genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP3A5, and ABCB1 on the steady-state plasma concentrations of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit.* 2014; 36(5):651-5.

Tang MC, Zou Y, Watanabe K, Walsh CT, Tang Y. Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis. *Chem Rev.* 2017; 117(8):5226-5333.

Teh LK, Bertilsson L. Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012; 27(1):55-67.

Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K. Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 341(1):294-305.

Thomas JE, Caballero J, Harrington CA. The Incidence of Akathisia in the Treatment of Schizophrenia with Aripiprazole, Asenapine and Lurasidone: A Meta-Analysis. *Curr Neuropharmacol.* 2015; 13(5):681-91.

- Toscano C, Klein K, Bliedernicht J, Schaeffeler E, Saussele T, Raimundo S, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A: evidence for modulation of splicing events. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16(10):755-66.
- Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, Szever Z, Monostory K. Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med*. 2015; 12(3):199-207.
- Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, Monostory K. Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016; 19(12). pii: pyw083.
- Tuplin EW, Holahan MR. Aripiprazole, A Drug that Displays Partial Agonism and Functional Selectivity. *Curr Neuropharmacol*. 2017; 15(8):1192-1207.
- Turpeinen M, Korhonen LE, Tolonen A, Uusitalo J, Juvonen R, Raunio H, Pelkonen O. Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: comparison of three tests. *Eur J Pharm Sci*. 2006; 29(2):130-8.
- Uckun Z, Baskak B, Ozel-Kizil ET, Ozdemir H, Devrimci Ozguven H, Suzen HS. The impact of CYP2C19 polymorphisms on citalopram metabolism in patients with major depressive disorder. *J Clin Pharm Ther*. 2015; 40(6):672-9.
- van der Hoeven TA, Coon MJ. Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem*. 1974; 249(19):6302-10.
- van der Weide K, van der Weide J. The Influence of the CYP3A4*22 Polymorphism and CYP2D6 Polymorphisms on Serum Concentrations of Aripiprazole, Haloperidol, Pimozide, and Risperidone in Psychiatric Patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2015; 35(3):228-36.
- Varese F, Smeets F, Drukker M, Lieverse R, Lataster T, Viechtbauer W, Read J, van Os J, Bentall RP. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophr Bull*. 2012; 38(4):661-71.
- Vaz ADN. Dioxygen activation by cytochromes P450: A role for multiple oxidants in the oxidation of substrates. *Drug Metabolizing Enzymes, Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development* (Szerkesztette Jae S. Lee, Scott Obach, Michael B. Fisher). 2003; Chapter 1:1-32.
- Waade RB, Christensen H, Rudberg I, Refsum H, Hermann M. Influence of comedication on serum concentrations of aripiprazole and dehydroaripiprazole. *Ther Drug Monit*. 2009; 31(2):233-8.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*. 2011; 11(4):274-86.
- Wang D, Papp AC, Sun X. Functional characterization of CYP2D6 enhancer polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(6):1556-62.

Wang D, Poi MJ, Sun X, Gaedigk A, Leeder JS, Sadee W. Common CYP2D6 polymorphisms affecting alternative splicing and transcription: long-range haplotypes with two regulatory variants modulate CYP2D6 activity. *Hum Mol Genet.* 2014; 23(1):268-78.

Wedemeyer RS, Blume H. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors: an update. *Drug Saf.* 2014; 37(4):201-11.

Wenthur CJ, Lindsley CW. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4(7):1018-25.

Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(6):755-61.

Yamamoto T, Suzuki A, Kohno Y. High-throughput screening to estimate single or multiple enzymes involved in drug metabolism: microtitre plate assay using a combination of recombinant CYP2D6 and human liver microsomes. *Xenobiotica.* 2003; 33(8):823-39.

Yang X, Zhang B, Molony C, Chudin E, Hao K, Zhu J, Gaedigk A, Suver C, Zhong H, Leeder JS, Guengerich FP, Strom SC, Schuetz E, Rushmore TH, Ulrich RG, Slatter JG, Schadt EE, Kasarskis A, Lum PY. Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res.* 2010; 20(8):1020-36.

Yucel E, Sancar M, Yucel A, Okuyan B. Adverse drug reactions due to drug-drug interactions with proton pump inhibitors: assessment of systematic reviews with AMSTAR method. *Expert Opin Drug Saf.* 2016; 15(2):223-36.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(1):23-37.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(1):103-41.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 392(6):1093-108.

Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48(11):689-723.

Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther.* 2017; 102(4):688-700.

12 FÜGGELÉK

23. táblázat. SNP kimutatáshoz alkalmazott oligonukleotidok szekvenciái

	Szekvencia 5'→3'	C _v (nM)	T _a (°C)
<i>CYP2C19*2 F</i>	CTT AGA TAT GCA ATA ATT TTC CCA C	300	60,5
<i>CYP2C19*2 R</i>	GAA GCA ATC AAT AAA GTC CCG A	300	
<i>CYP2C19*2 W</i>	FAM-TGA TTA TTT CCC G GG AAC CCA TAA C-BHQ1	100	
<i>CYP2C19*2 M</i>	CalRed610-TGA TTA TTT CCC A GG AAC CCA TAA C-BHQ2	200	
<i>CYP2C19*3 F</i>	AGA TCA GCA ATT TCT TAA CTT GAT G	300	58
<i>CYP2C19*3 R</i>	TGT ACT TCA GGG CTT GGT C	300	
<i>CYP2C19*3 W</i>	FAM-ACC CCC TG G ATC CAG G-BHQ1	100	
<i>CYP2C19*3 M</i>	CalRed610-ACC CCC TG A ATC CAG G-BHQ2	200	
<i>CYP2C19*17 F</i>	ATGAACAGGATGAATGTGGTAT	300	58,5
<i>CYP2C19*17 R</i>	TCTTCTGATGCCATCGT	300	
<i>CYP2C19*17 W</i>	FAM-TCT GTT CTC AAA G C A TCT CTG ATG T-BHQ1	100	
<i>CYP2C19*17 M</i>	HEX-TCT GTT CTC AAA G T A TCT CTG ATG T-BHQ1	200	
<i>CYP2C19*4 F</i>	CAA AGA GGC ACA CAC ACT TA	400	61
<i>CYP2C19*4 R</i>	CCA GAT TGA AAG GAG AAG CA	400	
<i>CYP2C19*4 W</i>	FAM-CAA GAG GAG AAG GCT TCA A TG GAT-BHQ1	200	
<i>CYP2C19*4 M</i>	HEX-CAA GAG GAG AAG GCT TCA G TG GAT-BHQ1	200	
<i>CYP3A4*1B F</i>	TCT GTA GGT GTG GCT TGT TG	300	62
<i>CYP3A4*1B R</i>	AAG GGT TCT GGG TTC TTA TCA G	300	
<i>CYP3A4*1B W</i>	HEX-TCG CCT CTC T C T TGC CCT TGT-BHQ1	200	
<i>CYP3A4*1B M</i>	FAM-TCG CCT CTC T C C TGC CCT TG-BHQ1	100	
<i>CYP3A4*22 F</i>	CAG AGG TAG GTC TAA TTC AGT TCA	400	62
<i>CYP3A4*22 R</i>	AGA TCA CCT TCT ATC ACA CTC C	400	
<i>CYP3A4*22 W</i>	FAM-ATC ACA CCC AG C GTA GGG C-BHQ1	200	
<i>CYP3A4*22 M</i>	HEX-ATC ACA CCC AG T GTA GGG CC-BHQ1	50	
<i>CYP3A5*3 F</i>	GAG AGT GGC ATA GGA GAT ACC	300	60,5
<i>CYP3A5*3 R</i>	TGT ACG ACA CAC AGC AAC C	300	
<i>CYP3A5*3 W</i>	FAM-TTT GTC TTT CA A TAT CTC TTC CCT GT-BHQ1	100	
<i>CYP3A5*3 M</i>	CalRed610-TTT GTC TTT CA G TAT CTC TTC CCT GT-BHQ2	200	

	Szekvencia 5'→3'	C _v (nM)	T _a (°C)
<i>CYP2D6*3 F</i>	TGG CAA GGT CCT ACG C	300	60,5
<i>CYP2D6*3 R</i>	TCC ATC TCT GCC AGG AAG	300	
<i>CYP2D6*3 W</i>	FAM-CAC A GG ATG ACC TGG GAC C-BHQ1	100	
<i>CYP2D6*3 M</i>	CalRed610-CAC GGA TGA CCT GGG ACC-BHQ2	100	
<i>CYP2D6*4 F</i>	CTT CGC CAA CCA CTC C	300	55
<i>CYP2D6*4 R</i>	GAT CAC GTT GCT CAC G	300	
<i>CYP2D6*4 M</i>	FAM-CCC CA A GAC GCC C-BHQ1	100	
<i>CYP2D6*4 W</i>	HEX-CCC CA G GAC GCC C-BHQ1	200	
<i>CYP2D6*6 F</i>	TCT CCG TGT CCA CCT TG	300	59
<i>CYP2D6*6 R</i>	GCG AAG GCG GC ACA	300	
<i>CYP2D6*6 W</i>	FAM-GCT GGA GCA G TG GGT GAC-BHQ1	100	
<i>CYP2D6*6 M</i>	CalRed610-GCT GGA GCA GGG GTG AC-BHQ2	100	
<i>CYP2D6*10 F</i>	TGA GGC AGG TAT GGG GCT A	300	63
<i>CYP2D6*10 R</i>	CAG GTT GCC CAG CCC	300	
<i>CYP2D6*10 W</i>	FAM-GCA CGC TAC C CA CCA GGC-BHQ1	200	
<i>CYP2D6*10 M</i>	CalRed610-GCA CGC TAC T CA CCA GGC-BHQ2	200	
<i>CYP2D6*41 F</i>	TGG CTG ACC TGT TCT CTG C	300	62
<i>CYP2D6*41 R</i>	CCT GGT CAA GCC TGT GCT	300	
<i>CYP2D6*41 W</i>	FAM-GCC GAG GGA G GA AGG GTA CAG-BHQ1	100	
<i>CYP2D6*41 M</i>	CalRed610-GCC GAG GGA G AA AGG GTA CAG-BHQ2	100	

F: forward primer; R: reverz primer; W: vad próba; M: mutáns próba; C_v: végkoncentráció; T_a: primer bekötési hőmérséklet

24. táblázat. RT-PCR mérésekhez alkalmazott protokollok

	Luminaris Probe qPCR MasterMix			Kapa Probe Fast qPCR MasterMix		
	Hőmérséklet (°C)	Idő	Ciklusszám	Hőmérséklet (°C)	Idő	Ciklusszám
UDG előkezelés	50	2 perc	1	-	-	-
Kezdő denaturáció	95	10 perc	1	95	3 perc	1
Denaturáció	95	15 mp	50	95	3 mp	50
Annelláció/extenzió	55-65	60 mp		55-65	20 mp	

UDG: Uracil-DNS Glikoziláz

25. táblázat. mRNA expresszió méréséhez alkalmazott oligonukleotidok szekvenciái

	Szekvenciák 5'→3'	C _v (nM)
<i>GAPDH F</i>	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	200
<i>GAPDH R</i>	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	200
<i>GAPDH P</i>	FAM-TGG GGA AGG TGA AGG TCG-BHQ1	150
<i>3A4 v2 F</i>	CCC ACA CCT CTG CCT T	200
<i>3A4 v2 R</i>	GAT CAT GTC AGG ATC TGT GAT	300
<i>3A4 v1 P</i>	HEX-AGT ATG GAA AAG TGT GGG GCT T-BHQ1	200
<i>2C19 v2 F</i>	ATC AGG ATT GTA AGC ACC C	400
<i>2C19 v2 R</i>	TTC TCC AAA ATA TCA CTT TCC AT	400
<i>2C19 v2 P</i>	HEX-CCA CTA TCA TTG ATT ATT TCC CGG-BHQ1	200

F: forward primer; R: reverz primer; W: vad próba; M: mutáns próba; C_v: végkoncentráció

26. táblázat. Aripiprazol mellett párhuzamosan alkalmazott hatóanyagok pszichiátriai betegeknél

Minta	CYP2D6 genotípus	Aripiprazol mellett párhuzamosan alkalmazott hatóanyagok											
		Nincs	Klozapin	Haloperidol	Kvetiapin	Risperidon	Klonazepám	Valproát	Lamotrigin	Propranolol	Metoprolol	Metformin	
P8	*1/*4					+						+	
P9	*1/*1				+		+						
P19	*1/*4					+	+	+				+	
P48	*1/*4				+			+					
P49	*1/*1xN				+								+
P67	*1/*1	+											
P70	*3/*4										+		
P90	*1/*10		+										
P91	*1xN/*41						+					+	
P92	*1/*41		+										
P95	*1/*1			+									
P104	*1/*1			+				+					
P105	*1/*4										+		
P106	*1/*1xN				+	+	+						
P113	*1/*4		+										
P131	*1/*4					+							
P163	*1/*1			+				+					
P184	*1/*1			+									
P207	*1/*1		+										+
P213	*1/*1				+	+	+	+				+	
P225	*1/*1		+				+						+
P226	*1/*41						+						
P233	*1/*1		+										
P246	*1/*1	+											

Minta	CYP2D6 genotípus	Nincs	Klozapin	Haloperidol	Kvetiapin	Risperidon	Klonazepám	Valproát	Lamotrigin	Propranolol	Metoprolol	Metformin
P253	*1/*1		+									
P258	*1/*4		+							+		
P264	*1/*4						+					
P271	*1/*41	+										
P272	*1/*41							+				
P277	*1/*1			+		+	+					
P278	*1/*41	+										
P280	*1/*1	+										
P283	*1/*4						+					
P284	*4/*41		+							+		
P285	*1/*1		+									
P286	*1/*1		+							+		
P287	*1/*4		+					+				
P288	*1/*4		+								+	
P289	*1/*41	+										
P290	*1/*4			+		+	+					
P291	*1/*1									+		
P292	*1/*5					+				+		
P293	*4/*41	+										
P294	*1/*1									+		
P295	*1/*4		+									
P296	*1/*4		+									
P297	*1/*41		+								+	+
P298	*1/*1									+		
P299	*1/*41										+	+
P300	*1/*41	+										
P301	*1/*1	+										
P302	*1/*4	+										
P303	*1/*41		+									
P304	*3/*5		+									
P305	*1/*1			+								
P306	*1/*1			+								
P307	*4/*5					+	+					
P308	*1/*1				+		+				+	
P309	*1/*1		+							+		
P314	*1/*4	+										
P315	*1/*1					+	+					
P316	*4/*4					+	+				+	+
P317	*4/*10		+									
P318	*1/*1	+									+	
P319	*1/*1		+							+		
P320	*1/*5		+							+		
P321	*1/*3		+					+				+
P322	*1/*4									+		

Minta	CYP2D6 genotípus	Nincs	Klozapin	Haloperidol	Kvetiapin	Risperidon	Klonazepám	Valproát	Lamotrigin	Propranolol	Metoprolol	Metformin
P323	*1/*4				+	+		+		+		
P324	*1/*1				+		+					
P325	*4/*10		+									
P326	*4/*4						+					
P327	*1/*1									+		
P328	*1/*5									+		
P329	*1/*1				+	+				+		
P332	*1/*1								+			
P334	*1/*4										+	+
P335	*1/*4				+	+		+		+		
P337	*4/*4						+					
P340	*1/*1				+		+				+	
P341	*1/*1		+								+	
P342	*1/*4		+							+		
P343	*4/*4						+					
P344	*1/*4		+						+		+	+
P345	*1/*41	+										
P346	*1/*1				+	+				+		
P347	*10/*10		+							+		
P348	*1/*41	+										
P350	*1/*1xN											+
P355	*1/*1					+		+	+			
P357	*1/*1		+									
P363	*1/*41	+										
P368	*1/*1xN		+								+	

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

ADATLAP a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Kiss Ádám Ferenc**

A doktori értekezés címe és alcíme: **GENOTÍPUS ALAPJÁN TÖRTÉNŐ CYP2C19 ÉS CYP2D6 FENOTÍPUS BECSLÉS ÉS KLINIKAI ALKALMAZHATÓSÁGA**

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Szerkezeti biokémia program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Monostory Katalin PhD

A témavezető munkahelye: MTA Természettudományi Kutatóközpont

MTA Adatbázis-azonosító: 10055934

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2019.113

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Doktori Iskola hivatalának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

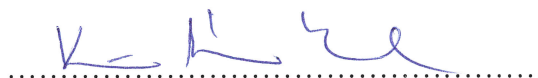
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) a ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019. május 23.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása