

# **A CYP Enzim Fenokonverzió Jelentősége a Transzplantációs Immunszuppresszióban, valamint Krónikus Vesebetegségben**

**Doktori Tézisek**

**Déri Máté Tamás**

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Csala Miklós, DSc., egyetemi tanár

Dr. Tihanyi Károly, kandidátus, tudományos tanácsadó

Komplex vizsga szakmai bizottság;

Elnök: Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tekes Kornélia, D.Sc., professor emerita

Dr. Szatmári István, Ph.D., vegyészmérnök

**Budapest**

**2021**

## 1. Bevezetés

Az élőlények számos módon kapcsolatba kerülhetnek testidegen anyagokkal, úgynevezett xenobiotikumokkal (gyógyszerek, növényvédő szerek, tartósító szerek, környezetszennyező anyagok, stb.). Akár a légkörből, élelmiszerekből vagy gyógyszer-készítményekből származnak is a testidegen anyagok, az élő szervezet törekszik az eltávolításukra. Az evolúció során minden élőlényben kialakult egy metabolikus rendszer, amely a xenobiotikumok lebontásáért és kiürítéséért felel.

A betegek gyógyszeres terápiája során elsődleges szempont a kívánt farmakológiai hatás elérése mellett a káros mellékhatások elkerülése. A gyógyszerhatás elmaradása vagy a mellékhatások kialakulása napjainkban is komoly kihívások elé állítják a kezelőorvosokat. A terápiás hatáshoz szükséges dózisok egyénenként jelentős eltéréseket mutathatnak, amely többek között függ az adott szervezet gyógyszer-lebontó képességétől. Az optimális gyógyszerhatás elérése érdekében nem elegendő a hatóanyagok hatásmechanizmusával foglalkozni (farmakodinámiai folyamatok), hanem elengedhetetlen a hatóanyagok farmakokinetikai vizsgálata, illetve a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének jellemzése, amely alapját képezheti a személyre szabott gyógyszeres terápiának. Dolgozatomban a gyógyszer-metabolizmusban mutatókozó egyének közti eltéréseket tárgyaltam részletesebben.

## 2. Célkitűzések

A betegek multidrog terápiája a metabolikus gyógyszer-interakciók kialakulását tekintve komoly kockázati tényező. A genetikai és nem-genetikai háttérű, a gyógyszer-metabolizmusban megnyilvánuló egyéni különbségek miatt lényeges, hogy a terápia a betegek egyéni gyógyszer-lebontó kapacitásához igazodjon a lehetséges mellékhatások, valamint a hatástalanság elkerülése érdekében. A gyógyszer-metabolizáló kapacitásban mutatókozó interindividuíális különbségek számos esetben a nagyfokú genetikai polimorfizmusra vezethetők vissza, azonban a CYP enzimek genetikai polimorfizmusa csak részben ad magyarázatot a gyógyszer-metabolizmusban mutatókozó egyéni különbségekre. A CYP gének kifejeződését

számos folyamat egymásra hatása szabályozza, melyek lehetnek külső (gyógyszeres kezelés, alkoholfogyasztás, dohányzás), illetve belső tényezők is (nem, életkor, hormonális állapot, betegségek). A génexpresszió és/vagy az enzimaktivitás változása pedig a CYP genotípus fenokonverziójához vezethet. A CYPtest™ komplex diagnosztikai rendszer a CYP gének klinikailag releváns mutációinak integratív elemzésén és a fő gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek mRNS-expresszió mérésén alapul, használatával becsülhető a betegek gyógyszer-metabolizáló képessége. A CYPtest™ módszer kelléktárát felhasználva célunk volt, hogy:

- a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére fejlesztett CYPtest™ diagnosztikai rendszert, az alacsony CYP mRNS expresszió szintek (pl. végstádiumú vesebetegségben szenvedő páciensek) és a korlátozott mennyiségben rendelkezésünkre álló biológiai minták miatt, a pontos és megbízható mérés érdekében optimalizáljuk, finomítsuk;
- végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegeknél és összehasonlításképp egészséges szervdonoroknál meghatározzuk a 4 legfontosabb gyógyszer-metabolizáló CYP enzim (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4) mRNS expresszióját a CYPtest™ eljárás optimalizáció eredményeképp kapott módszerrel;
- megvizsgáljuk kettő, a kaukázusi populációban legalább 1%-os allélgyakorisággal megtalálható CYP3A4 polimorfizmus, a *CYP3A4\*1B* és *CYP3A4\*22* allélokra jellemző mutációk hatását a CYP3A4 enzim mRNS expressziójára szívtranszplantált betegeknél;
- felmérjük szívtranszplantált betegeknél a korai posztoperatív időszakban a CYP3A-státusz (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 mRNS expresszió) összefüggését a takrolimusz expozíciójával; feltárjuk, hogy van-e korreláció a betegek CYP3A-státusza és a dózis/testtömeggel normalizált vérszintek, valamint a terápiás vérszinthez szükséges takrolimusz dózisok közt;
- megvizsgáljuk, hogy szervátültetés után közvetlenül, valamint a műtétet követő 15 hónapban milyen hatása van az idő függvényében változó kortikoszteroid dozírozásnak a CYP3A4 enzim mRNS expressziójára és ebből kifolyólag a CYP3A4 által katalizált takrolimusz-metabolizmusra;

- májtranszplantált betegeknél szeretnénk volna megvizsgálni a donor máj-graft és a recipiens gasztrointesztinális traktusában a *CYP3A5\*1* jelentőségét a takrolimusz vérszint kialakulásában a korai posztoperatív időszakban.

### 3. Módszerek

#### Klinikai minták

A szervdonoroktól (N=110) és a végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegektől (N=105) származó vérminták, valamint a felnőtt májtranszplantált betegek (N=69) bevonásával készült prospektív vizsgálatban felhasznált minták a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikájáról, a szívátültetéseken átesett felnőtt betegek (N=232) vérmintái a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikájáról érkeztek laboratóriumunkba. A Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportja rendelkezik az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével a fent felsorolt klinikai minták tudományos célból történő felhasználásához; (4799-0/2011-EKU, 2112-2/2017/EKU, 32911-2/2019/EKU). A vizsgálatokat a vonatkozó irányelveknek és rendeleteknek megfelelően végeztük (Az egészségügyről szóló 1997. évi CLIV. törvény, a 23/2002. (V. 9.) EüM rendelet, Helsinki Nyilatkozat). Minden vizsgálatban résztvevő beteg, a tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez. A vérminták levétele a donorok esetén a szervkivétel idején, a vesebetegeknél és a szervtranszplantált pácienseknél a pedig a reggeli gyógyszerelés előtt történt. A szívtranszplantált recipiensek utánkövetéses vizsgálata során, a *CYP3A4* mRNS expressziót nem csak a korai posztoperatív időszakban, hanem 1, 3, 6, 12 és 15 hónappal a műtét után is mértük. Az utánkövetéses időszak mintavételi időpontjaiban természetesen a takrolimusz vérszint értékek is rögzítésre kerültek.

## **Leukocita izolálás**

A perifériás vérminták hűtve, EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátlót tartalmazó vérvételi csövekben érkeztek a Természettudományi Kutatóközpontba. A vérminták feldolgozása során a vörösvértestektől megtisztított fehérvérsejteket DNS izoláláshoz PBS (foszfát tartalmú sóoldat) pufferben szuszpendáltuk, RNS izoláláshoz pedig RNS izoláló reagensbe tettük, és felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

## **RNS izolálás**

Az RNS izolálás optimalizációjához hat kereskedelmi forgalomban kapható, folyadék-folyadék extrakción alapuló RNS izoláló reagenst hasonlítottunk össze a kinyert termék tisztasága, a teljes RNS kitermelés és a pénzügyi vonzat szempontjából: (1.) TRIzol™ reagens (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), (2.) TRI Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH), (3.) Trizolate Reagent® (UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen), (4.) RiboZol® RNS extrakciós reagens (Amresco LLC/VWR Life Scientific, Solon, OH), (5.) RNAzol® RT reagens (Molecular Research Center Inc.) és (6.) NucleoZOL reagens (MACHEREY–NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Németország). A hat RNS izoláló reagens megfelelő összehasonlíthatósága érdekében az RNS-t három egészséges alanyból összekevert, azonos mennyiségű ( $10^7$ ) leukocitából izoláltuk. A leukocitákat 1-1 ml RNS kivonó reagensben vettük fel, majd az RNS izolálását a gyártó utasításai szerint végeztük. A minták RNS koncentrációját és tisztaságát az RNS oldatok UV/Vis spektruma alapján NanoDrop 1000™ spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztuk meg (A260/280, A260/230). A klinikai minták RNS izolálásához a legmegfelelőbbnek talált „TRI Reagent®” terméket használtuk. A mintákat további felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

## **Reverz Transzkripció**

Az izolált totál RNS reverz transzkripció optimalizációjához öt, kereskedelmi forgalomban kapható cDNS (RNS szekvenciára komplementer DNS szekvencia) szintézis készletet hasonlítottunk össze a reverz transzkripció hatékonysága és a

dinamikus tartomány szempontjából, valós idejű PCR, ún. qPCR (quantitative polymerase chain reaction) technikával: (1.) Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific), (2.) qPCRBIO cDNS Synthesis Kit (PCR Biosystems Ltd., London, Nagy-Britannia), (3.) FastGene Scriptase Basic cDNA Kit (NIPPON Genetics Co. Ltd, Tokió, Japán), (4.) iScript™ cDNS Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA) és (5.) SensiFAST™ cDNS Synthesis Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, Németország). Az amplifikáció analitikai érzékenységét, linearitását és hatékonyságát hasonlítottuk össze a kiindulási RNS minta 1:5 arányú hígításainak felhasználásával. A kiindulási (teljes) RNS mennyiség hígítási sora a 4 µg és 51,2 pg közti tartományt fedte le. Az amplifikáció során kapott Cq értékek alapján felvett standard görbék minőségét a meredekség, a korrelációs együttható ( $R^2$ ) és az amplifikációs hatékonyság segítségével értékeltük. A „duplázódó” amplifikációs rátával elméletben exponenciálisan képződik a PCR termék, amely -3,3 meredekségű standard koncentráció görbét eredményez, míg az  $R^2 > 0,9$  valamint a hatékonyság 90 és 110% közti értékei elfogadhatóak. A reverz transzkripció reakciókat minden esetben a gyártó utasításait követve végeztük el.

### **Relatív mRNS expresszió mérés kvantitatív valós-idejű polimeráz lánreakcióval (qPCR)**

A cDNS amplifikációhoz a KAPA Probe Fast qPCR kits (Universal) terméket használtuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A CYP mRNS-ek mennyiségét a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) referencia gén mRNS expressziójához viszonyítva határoztuk meg úgy, hogy a vizsgálandó mintákban a GAPDH transzkripcióját stabilnak tekintve 1-nek vettük, és a CYP mRNS szintjét a GAPDH expresszióhoz viszonyítottuk. A duplex méréshez optimalizáltuk a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 primereket és próbákat. A fluoreszcens „TaqMan” típusú hidrolízis próba oligonukleotidokat FAM (fluoreszcein amidit) fluorofórral (GAPDH) és HEX (hexakloro-fluoreszcein) fluorofórral (CYP) jelölve rendeltük meg (Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország). A qPCR hőprofilja az alábbi lépésekből állt: 95°C 3 perc előzetes

denaturáció, ezt követően 50 ciklusban ismételve a 95°C 3 másodperc denaturációs és 58°C 30 másodperc amplifikációs fázisokat (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories Inc). Az adatokat a CFX Maestro Software-rel elemeztük (Bio-Rad Laboratories Inc).

### **CYP3A4 és CYP3A5 allélvariánsokra jellemző SNP-k kimutatása**

A *CYP3A5* és *CYP3A4* allélokát (*CYP3A5\*3*, *CYP3A4\*1B* és *CYP3A4\*22*) SNP kimutatással, hidrolízis „TaqMan” detektálási módszerrel végeztük. A genotipizáláshoz szükséges primer és a fluorofórral jelölt próba oligonukleotid szekvenciákat az Eurofins Genomics-től rendeltük (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Németország), a qPCR reakciót pedig a „Luminaris Probe qPCR Master Mix” polimeráz enzim készítménnyel végeztük a gyártó ajánlásait követve (Thermo Fischer Scientific Inc.). A genotípusokat poszt PCR allél-diszkriminációval különböztettük meg, a vad és mutáns allélok relatív fluoreszcencia értékei alapján.

### **CYPtest™**

A CYPtest™ diagnosztikai rendszert a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére fejlesztették ki a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportban. A módszer a CYP gének klinikailag releváns mutációinak integratív elemzésén és a fő gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek mRNS-expresszió mérésén alapul. A kutatócsoport korábbi eredményei szerint perifériás leukocitákból mért CYP expresszió alapján becsülhető a májszövetben mérhető enzimaktivitás a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és a CYP3A4 enzimeknél. A CYP mRNS értékek alapján a betegek három expressziós kategóriába (alacsony, átlagos, magas expresszió) sorolhatók, a kategóriák közötti határértékeket a kutatócsoport korábbi vizsgálatai alapján határozták meg. A perifériás vér leukocitái megfelelő biológiai mintának számítanak a CYP enzim függő gyógyszer-metabolizáló képesség vizsgálatához, mivel minimálisan invazív módon, könnyen hozzáférhetők, aktív RNS-szintézist mutatnak és tükrözik a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek májban mérhető aktivitását.

A dominánsan CYP3A enzimek (CYP3A5, CYP3A4) által metabolizált takrolimusz napjainkban igen széles körben alkalmazott, és a modern immunszuppresszió sarokkövének, alapvető gyógyszerének számít. A fent kifejtett eljárások segítségével mért *CYP3A5* genotípus, valamint *CYP3A4* mRNS expresszió alapján megállapítható a betegek CYP3A státusza mely alapján becsülhető a takrolimusz metabolizáló kapacitás a recipiensek CYP3A státusza alapján pedig optimalizálható a takrolimusz kezdő dózisa.

### **Immunszuppresszív takrolimusz terápia**

A májátültetett betegek takrolimusz kezelését 6 órával, a szívtranszplantált páciensek takrolimusz kezelését pedig a műtét után 5 nappal kezdték meg, ezt követően a takrolimuszt (Prograf, Astellas Pharma Inc.) napi kétszeri adagban alkalmazták. A reggeli dózis a takrolimusz mélykoncentráció ( $C_0$ ) méréshez szükséges vérvétel után került bevételre, az esti dózistra pedig a reggeli gyógyszerbevitelhez képest 12 órával később került sor. A takrolimusz kezdő dózísát a recipiens testtömegéhez (0,1 mg/kg) igazították, majd ezt követően a klinikai protokoll szerint, a reggeli dózis bevétele előtti mélykoncentráció alapján folytatták a dozírozást. A takrolimusz vérkoncentrációt enzim immunoesszé technikával a Dimension<sup>®</sup> rendszeren a Tacrolimus Flex Reagent Cartridge reagenssel mérték (Dade Behring Inc., Newark, DE). A napi takrolimusz dózis kiszámításához a  $(\text{cél } C_0 / \text{aktuális } C_0) \times \text{aktuális dózis}$  algoritmust alkalmazták. Az orális takrolimusz dózist a terápiás céltartományhoz igazították, ami a korai posztoperatív időszakban 10 és 15 ng/ml közti vérkoncentrációt jelent. A szívtranszplantált betegek utánkövetéses vizsgálata során a posztoperatív periódust követően az orális takrolimusz dózist a terápiás céltartományhoz igazították, mely az alábbiak szerint alakult: 6-12 hónapig 8-12 ng/ml, egy évvel a transzplantáció után pedig 5-10 ng/ml közti koncentráció. A recipiensek gyógyszerelését figyelemmel követtük, az erős CYP3A-gátló kezelésben részesült (pl. flukonazol, itraconazol) betegeket a további elemzésből kizártuk.



## Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzéseit a GraphPad InStat (version 3.10; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) alkalmazásával végeztük el. Három CYP mRNS expressziós kategóriát definiáltunk az alacsony, átlagos és magas expressziót mutató egyének csoportosítására. A leukocita CYP mRNS szint kategóriák határértékeit korábban a máj CYP enzimaktivitásának (CYP1A2: fenacetin O-dealkiláció; CYP2C9: tolbutamid 4-hidroxiláció; CYP2C19: mefenitoin 4'-hidroxiláció; CYP3A4: nifedipin oxidáció vagy midazolám 1'- és 4-hidroxiláció) határértékei alapján határozták meg a kutatócsoport munkatársai. A leukocitákban megállapított relatív CYP mRNS expressziós határértékek: (CYP1A2 ( $10^{-5}$  és  $5 \times 10^{-4}$ ), CYP2C9 ( $2 \times 10^{-6}$  és  $10^{-5}$ ), CYP2C19 ( $10^{-6}$  és  $10^{-5}$ ) és CYP3A4 ( $10^{-6}$  és  $10^{-4}$ )) lehetővé teszik, hogy perifériás vérminta elemzése alapján a betegeket besoroljuk alacsony, átlagos és magas CYP expressziós kategóriákba. A CYP expressziót 110 szervdonor, 105 végstádiumú vesebeteg leukocitáiban határoztuk meg és hasonlítottuk össze; a CYP expressziós adatok eloszlását Kolmogorov–Smirnov teszttel elemeztük, a csoportok közötti különbségeket pedig Mann–Whitney U teszt segítségével vizsgáltuk. A végstádiumú vesebetegeknél az alacsony, átlagos és magas expressziós értékek előfordulását  $\chi^2$  teszt segítségével hasonlítottam össze a szervdonorok expressziós értékeivel. Szívtranszplantált betegek posztoperatív CYP3A státuszának (CYP3A5 genotípus és CYP3A4 mRNS expresszió) és a takrolimusz farmakokinetikai paramétereinek összefüggéseit, a CYP3A4 mRNS expresszió és a takrolimusz vérkoncentráció időbeli alakulását, valamint májtranszplantált betegeknél a donor/recipiens genotípus kombinációk és a takrolimusz paraméterek összefüggéseinek kiértékelését Kruskal-Wallis variancia-analízissel, ezt követően pedig Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel értékeltük. A  $P < 0,05$  valószínűséggel jellemzett különbségeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. Eredmények

### CYP mRNS expresszió mérési módszer optimalizálása

#### RNS izolálás

A máj CYP aktivitása és a leukociták CYP mRNS koncentrációja átmenetileg rendkívül alacsony szintre csökkenhet egyes megbetegedésekben. Az alacsony CYP-expressziós szintek korlátozott mennyiségű mintából történő pontos és megbízható méréséhez szükséges volt az RNS izolálás, az RNS-cDNS reverz transzkripció és a qPCR eljárásokat optimalizálni.

A magas hozamú és minőségű RNS kitermelés érdekében összehasonlítottam hat, kereskedelmi forgalomban kapható RNS extrakciós reagenst ugyanazon perifériás leukocita populáción. A RiboZol-reagens használatával kaptam a legmagasabb, kinyerhető totál RNS koncentrációt, míg az RNS kihozatal a másik öt reagens alkalmazásával szignifikánsan alacsonyabb volt ( $P < 0,05$ ). Az RNS minták tisztaságának értékelésére abszorbancia arányokat alkalmaztunk, ideális tisztaságú minta esetén a 260/280 arány 2, illetve a 260/230 hányad a 2,0-2,2 tartományba esik. A kinyert RNS mennyiségét és tisztaságát tekintve a TRIzol™, Trizolate Reagent® és a TRI Reagent® reagensok hasonlóan alkalmasnak tekinthetők, a pénzügyi vonzatot tekintve azonban a TRI reagens volt a legkedvezőbb választás.

#### Rerverz transzkripció

Az alacsony CYP expressziós szintek méréséhez elengedhetetlen a rendkívül érzékeny és hatékony reverz transzkriptáz alkalmazása. Öt reverz transzkripció termékét teszteltem a leukocitákban mérhető CYP3A4 mRNS expresszió alapján. A CYP3A4 mRNS expresszió mérés legszélesebb dinamikus tartományát a Maxima First Strand cDNS szintézis kit-tel előállított cDNS termék mutatta, ezért a továbbiakban a klinikai mintákból kinyert RNS reverz transzkripciójához a legmegfelelőbbnek talált „Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit for RT-qPCR” terméket használtuk.

## **qPCR**

Az eredeti CYPtest™ módszer során a CYP mRNS expresszió méréshez FAM fluorofórral jelölt próbákat alkalmaztak a referencia és a CYP gének méréséhez is, ami nem tette lehetővé a multiplex reakciók kivitelezését. Ezért a CYPtest™ rendszer qPCR oligonukleotid komponenseit újraterveztük, a CYP és a referencia gének oligonukleotid próbáit különböző fluorofór jelzéssel (HEX és FAM) láttuk el. A primereket 1) két egymást követő exon régióra terveztük, melyek közt a megfelelő gDNS (genomi DNS) szakaszon az intron kellően nagy távolságot jelent (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19) vagy 2) az exon-exon határra átfedve 2 exon régiót (CYP3A4, GAPDH), így az amplikon kizárólag a CYP mRNS-ről származó cDNS-ből származik, és az esetleges gDNS-szennyeződés nem torzítja a reakció eredményét, ugyanakkor nincs szükség DNáz-zal történő előzetes emésztésre. Az újratervezett primer-próba kombinációkat és az egyes géntermékek mennyiségi meghatározását ötszörös hígítási faktorral készült templát cDNS hígítási sor elemzésével vizsgáltuk. Az amplifikációs hatékonyság a vizsgált gének esetén 94,8 és 106,2% közé esett, az  $R^2$  pedig mind a 4 vizsgált, valamint a referencia gén esetén (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 és GAPDH), nagyobb volt mint 0,99.

## **CYP mRNS expresszió végstádiumú vesebetegeknél**

A CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS expresszióját 105 végstádiumú vesebeteg és 110 egészséges vesefunkcióval jellemzett szervdonor leukocitáiból határoztuk meg. A betegek perifériás fehérvérsejtjeiben a rendkívül alacsony CYP expresszió módszer-optimalizálást igényelt a CYP mRNS-ek megfelelő detektálásához. A CYP mRNS expresszió vizsgálatát, a módszer optimalizáció során legalkalmasabbnak ítélt reagensekkel, a „TRI Reagent®” RNS izoláló és „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit” reverz transzkripció termékek alkalmazásával, valamint az újratervezett duplex qPCR kivitelezésére alkalmas oligonukleotid szekvenciákkal végeztük. A vesebetegek leukocitáiban mind a 4 vizsgált CYP mRNS expresszióban nagy volt az interindividuais variabilitás, 5-7 nagyságrendnyi különbség volt mérhető a legmagasabb és a legalacsonyabb érték között. A krónikus

vesebetegek összes vizsgált CYP mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, a szervdonorok expressziós értékeihez képest. A vesebetegek és a szervdonorok CYP expressziós medián értékei lényeges különböztek ( $P < 0,0001$ ), a legmagasabb mediánbeli különbség a CYP2C9 (600-szoros), a legalacsonyabb pedig a CYP2C19 (15-szeres) expresszióban volt megfigyelhető.

A szervdonorok és a végstádiumú vesebetegek CYP expressziójának összehasonlítása során szignifikáns különbségeket figyeltünk meg az alacsony, átlagos és magas CYP mRNS expresszálók arányában ( $\chi^2$ ; CYP1A2: 40,2, CYP2C9: 87,9, CYP2C19: 47,2, CYP3A4: 29,9; a szabadsági fok minden teszt esetén 2, a P érték pedig  $< 0,0001$  volt). A károsodott vesefunkciójú betegek többségénél alacsony volt a CYP expresszió (51–77%); míg a magas CYP expresszálók aránya 0–7% volt. Egészséges vesefunkciójú szervdonoroknál sokkal kisebb arányban volt jelen alacsony CYP expressziót mutató egyén (30% vagy kevesebb), valamint hangsúlyos volt a magas CYP mRNS expressziót mutató személyek aránya is (21–31%).

## **A CYP3A-státusz kapcsolata a takrolimusz vérkoncentrációval és dóziszigénnyel szívatültetett betegeknél**

### **A szívtranszplantált betegek CYP3A-státusza**

A szívatültetésen átesett betegeknél a kaukázusi populációra jellemző, klinikailag releváns, funkcióvesztő *CYP3A5\*3* polimorfizmust vizsgáltuk. *CYP3A5\*3* alléllra jellemző mutáció hiányában az allélt vad típusúnak, *CYP3A5\*1*-nek tekintettük. 232 szívtranszplantált beteg közül 230 hordozott legalább egy *CYP3A5\*3* allélt (34 *CYP3A5\*1/\*3* és 196 *CYP3A5\*3/\*3* genotípusú beteg), a *CYP3A5\*3* allél gyakorisága (91,8%) pedig megegyezett a kaukázusi fehér populációra vonatkozó irodalmi adatokkal (88–97%).

Vizsgáltuk a *CYP3A4* genotípus hatását a CYP3A4 mRNS expresszióra, azonban nem találtunk összefüggést a *CYP3A4* genotípus csoportok és a CYP3A4 mRNS expresszió között. A betegek máj CYP3A4 aktivitását a páciensek leukocitáinak CYP3A4 mRNS szintjéből becsültük meg, a betegeket alacsony, átlagos és magas

expressziójú csoportokba sorolva. A betegek több mint fele (56%) alacsony CYP3A4 mRNA expressziót mutatott, egy további jelentős része (43,1%) átlagos szinten expresszálta a CYP3A4-et, míg csak 2 beteg (<1%) mutatott magas CYP3A4 expressziót a korai posztoperatív időszakban (2 nappal a műtét után).

### **A szívatültetett betegek CYP3A-státusza és a takrolimusz expozíció összefüggései a korai posztoperatív időszakban**

A betegek CYP3A-státusza és a takrolimusz vérkoncentráció közötti összefüggést 163 recipiens esetében vizsgáltuk 15 nappal a transzplantációt követően. A szívtranszplantált recipiensek takrolimusz terápiája a transzplantációt követő 5. napon kezdődik és a 15. napon a takrolimusz vérszint többé-kevésbé eléri a steady-state állapotot. A korai posztoperatív CYP3A-státusz (CYP3A5 genotípus és a leukocitákból mért CYP3A4 mRNA expresszió) alapján a betegeket két fő kategóriába soroltuk: CYP3A5 expresszálók (*CYP3A5\*1/\*3* vagy *CYP3A5\*1/\*1* genotípussal rendelkezők) és nem-expresszálók (*CYP3A5\*3/\*3* genotípussal rendelkezők). A CYP3A5 enzimet nem-expresszálókat további két alcsoportra bontottuk: alacsony és átlagos CYP3A4 mRNA expressziót mutatók. A 163 recipiens közt nem volt olyan beteg, aki magas szinten expresszálta volna a CYP3A4 mRNA-t. A szívatültetett betegek CYP3A-státusza, valamint a dózissal és a testtömeggel normalizált takrolimusz vérkoncentrációja között jelentős összefüggést mutattunk ki. A CYP3A5 enzimet expresszáló betegeknél volt megfigyelhető a legalacsonyabb takrolimusz vérkoncentráció ( $C_0/D$ ); szignifikánsan alacsonyabb volt, mint azoknak a betegeknél a  $C_0/D$  értékei, akik nem rendelkeztek működőképes CYP3A5 enzimmel. A takrolimusz vérkoncentrációja az átlagos CYP3A4 mRNA szinttel rendelkező, de CYP3A5 enzimhiányos betegeknél körülbelül kétszerese volt, míg az alacsony CYP3A4 mRNA expressziójú betegek esetén négyszerese volt a CYP3A5 enzimet expresszáló betegeknél vérszintjének.

A működőképes CYP3A5 enzimmel rendelkező (*CYP3A5\*1* allélt hordozók) pácienseknél nagyobb takrolimusz dózissal volt szükség a terápiás vérkoncentráció eléréséhez, mint a CYP3A5 enzimmel nem rendelkező betegeknél (*CYP3A5\*3/\*3*).

A *CYP3A5*\*3/\*3 genotípussal rendelkező átlagos *CYP3A4* expressziót mutató betegek esetében a dóziszigény 30-40%-al volt magasabb, míg az alacsony *CYP3A4* expressziót mutatók esetében körülbelül 20%-al volt alacsonyabb a megfelelő dózis, mint az ajánlott 0,1 mg/testtömeg kg.

### **A *CYP3A4* mRNA expresszió és a takrolimusz expozíció időfüggése a szívtranszplantációt követő 15 hónapban**

78 szívtranszplantált betegnél vizsgáltuk a *CYP3A*-státusz (*CYP3A4* expresszió és *CYP3A5* genotípus) hatását a takrolimusz expozíciójára a transzplantációt követő 15 hónapban. A recipiensek *CYP3A4* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a transzplantációhoz legközelebb eső időpontban (a műtét utáni második napon), mint bármely későbbi időpontban (1, 3, 6, 12 és 15 hónap) ( $P < 0,0001$ ). A transzplantáció idején a betegek többsége (85%) alacsony szintű *CYP3A4* mRNS expressziót mutatott, ami a *CYP3A4* szubsztrátok szempontjából gyenge metabolizáló képességet jelent. A transzplantáció után 1 és 3 hónappal a recipienseknek már több mint a fele az átlagos *CYP3A4* expresszáló kategóriába esett. A longitudinális vizsgálat későbbi időpontjaiban (6 és 12 hónap) a betegek 70-85%-a az átlagos expresszáló kategóriába tartozott. A transzplantáció után 15 hónappal, amikor a metilprednizolon gyógyszerelést legalább már egy hónapja befejezték, az átlagos expressziót mutató recipiensek aránya csak 47% volt.

Mivel a *CYP3A5* enzimnek domináns szerepe van a takrolimusz metabolizmusában, a takrolimusz  $C_0$  koncentrációjának (dózissal és testtömeggel normalizált) változását külön-külön követtük a *CYP3A4* expresszáló és a *CYP3A5* enzimhiányos recipiensekben ( $N = 13$ ,  $N = 65$ ). A takrolimusz-kezelés általában a transzplantációt követő 5. napon kezdődött; ezért az első vérmintavétel időpontja melyből meghatároztuk a perioperatív *CYP3A4* mRNS expressziót, nem esett egybe a takrolimusz vérkoncentráció vizsgálatára szolgáló mintavétellel. A *CYP3A5* enzimet nem expresszáló betegekben (homozigóta *CYP3A5*\*3/\*3 genotípus) a takrolimusz vérszint (dózissal és a testtömeggel normalizált) enyhe csökkenése volt megfigyelhető a műtétet követő első hónapban; ez a csökkenés azonban

statisztikailag nem volt szignifikáns ( $P > 0,05$ ). A műtétet követő első hat hónapban a kiindulási szinthez képest nem volt szignifikáns különbség a takrolimusz dózissal és testtömeggel normalizált  $C_0$  koncentrációjában ( $P > 0,05$ ). A transzplantáció után 1 évvel és 15 hónappal később viszont szignifikánsan magasabb vérkoncentráció volt mérhető összehasonlítva a korábbi időpontok értékeivel (10 nap, 1, 3 és 6 hónap), ami valószínűleg a metilprednizolon dózis jelentős csökkenésének, valamint megvonásának volt köszönhető.

A CYP3A5 enzimet expresszáló szívtranszplantált recipienseknél (*CYP3A5\*1/\*3* genotípus) nem találtunk szignifikáns különbséget a dózissal és testtömeggel normalizált takrolimusz vérszintek közt a különböző időpontokban.

### **A donor és recipiens *CYP3A5* genotípus meghatározásának klinikai jelentősége májtranszplantált betegeknél**

Korábbi kutatási eredmények igazolták, hogy májtranszplantált betegeknél a donor máj CYP3A-státuszához igazított kezdeti takrolimusz terápia csökkenti a kalcineurin inhibitor gyógyszer túladagolás vagy alul-dozírozás kockázatát, ami hozzájárulhat a hibás dozírozás következtében kialakuló graft károsodás elkerüléséhez a transzplantációt követő korai posztoperatív időszakban. *CYP3A5\*3/\*3* genotípussal rendelkező átlagos CYP3A4 mRNS expressziót mutató donor máj beültetése esetén, a recipiensek terápiás vérszintjéhez szükséges takrolimusz dózis többé-kevésbé megegyezett a testtömeg alapján kiszámolt dózissal (0,1 mg/kg). Azoknál a betegeknél, akiket alacsony CYP3A4 expressziót mutató grafftal transzplantáltak, lényeges (kb. 50%) dózis csökkentésre volt szükség (0,047 mg/kg takrolimusz,  $P < 0,001$ ), míg a magas CYP3A4 expressziót mutató grafftal transzplantált recipienseknél, vagy ha a donor genom legalább egy kópiában hordozta vad típusú *CYP3A5\*1* allélt, a takrolimusz dózist 100% -kal (0,21 mg/kg,  $P < 0,001$ ) növelni kellett a testtömeg alapján kalkulált dózishoz viszonyítva a megfelelő vérkoncentráció eléréséhez.

A takrolimusz metabolizmusa azonban nem kizárólag a máj CYP3A enzimeit által megy végbe, a felszívódott hatóanyag egy része már a bélfalban, a vékonybél

CYP3A enzimeinek segítségével átalakul. Májtranszplantáció esetén nincs teljes szakmai egyetértés az orális takrolimusz készítmények farmakokinetikájával kapcsolatban. Egyes vizsgálatok csak a graft takrolimusz metabolizáló kapacitását találták meghatározónak, míg más tanulmányok a recipiens vékonybél metabolikus kapacitását is lényeges tényezőként állapították meg.

A fent említett eredmények hatására, a szakirodalomban jelentős takrolimusz metabolizálóként leírt 2 szerv (a máj és a bélfal) genotipizálásával vizsgáltuk a donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombináció hatását a takrolimusz vérkoncentrációra, valamint a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózisa májtranszplantáción átesett betegeknél. A dózissal és testtömeeggel normalizált takrolimusz vérkoncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt a működőképes *CYP3A5* enzimmel rendelkező (*CYP3A5\*1* allélt hordozó) májjal transzplantált betegekben, mint a *CYP3A5* enzimet nem expresszáló grafftal rendelkező recipiensekben (*CYP3A5\*3/\*3*). A donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációk vizsgálatából kapott eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a korai posztoperatív időszakban a donor máj *CYP3A5* genotípusa meghatározó, míg a recipiens *CYP3A5* genotípusa indifferens a takrolimusz vérkoncentrációjára nézve.

A donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombináció és a terápiás vérszint beállításához szükséges dózis összefüggésének vizsgálata alapján az látható, hogy ugyancsak a donor máj genotípusa a hangsúlyosabb tényező a célkoncentráció eléréséhez szükséges dózis mértékének meghatározásához.

## 5. Következtetések

- A Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport által, a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének becslésére fejlesztett CYPtest™ diagnosztikai rendszert, az alacsony CYP mRNS expresszió szintek (pl. végstádiumú vesebetegek) és a korlátozott mennyiségben rendelkezésünkre álló biológiai minták miatt, a pontos és megbízható mérés érdekében optimalizáltuk, finomítottuk. A módszer-optimalizáció magában foglalta az RNS extrakció, a reverz



transzkripció és a qPCR lépéseit is. A gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS expressziójának vizsgálatához legalkalmasabbnak a „TRI Reagent®” és „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit” termékeket, valamint az újratervezett oligonukleotid szekvenciákkal végzett duplex qPCR mérést tartottuk. A qPCR technika érzékeny és pontos módszernek bizonyult a CYP génexpresszió leukocitákban történő méréséhez alacsony koncentrációjú kiindulási RNS mennyiségek mellett is.

- A módosításoknak köszönhetően, a végstádiumú vesebetegek leukocitáiban várható gyenge CYP expresszió ellenére a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS expresszió hatékonyan számszerűsíthető volt. A vizsgált CYP gének mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a végstádiumú vesebetegeknél, mint a normális vesefunkciójú szervdonoroknál. Eredményeink bizonyítékkul szolgálhatnak a CYP gének transzkripció „alulszabályozására” károsodott veseműködésű betegek esetében, ami magyarázatot jelent a klinikai vizsgálatok során tapasztalt gyógyszer-expozíció növekedésére.

- A betegek gyógyszer-metabolizáló képességét és ezzel a gyógyszeres kezelés hatékonyságát jelentősen befolyásolják a CYP enzimek genetikai polimorfizmusai, valamint olyan nem-genetikai tényezők, mint például maga a gyógyszeres terápia. A CYP3A enzimek variabilitását követtük szívtranszplantált betegeknél és megállapítottuk, hogy a feltehetőleg fokozott, illetve csökkent expresszióhoz vezető *CYP3A4\*1B* és *CYP3A4\*22* allélok az általunk vizsgált betegcsoportban nem eredményezték a CYP3A4 mRNS expressziójának változását. Megfigyelésünkéből arra következtettünk, hogy a betegeknél tapasztalt jelentős CYP3A4 expressziós különbségek egyéb, nem-genetikai tényezőknek is köszönhetőek, amelyek elfedhették a *CYP3A4* genotípus mRNS expresszióra gyakorolt hatását.

- Jól ismert, hogy a szívtranszplantált betegeknél alkalmazott immunszuppresszáns, a takrolimusz metabolizmusában a CYP3A5 enzimnek domináns szerepe van, azonban a működőképes CYP3A5 enzimet eredményező *CYP3A5\*1* allél csak viszonylag ritkán fordul elő a kaukázusi fehér populációban. Ezért a takrolimusz terápia szempontjából lényeges lehet mind a *CYP3A5* genotípus, mind pedig a CYP3A4 expresszió, azaz a CYP3A-státusz ismerete. Szignifikáns összefüggést mutattunk ki a szívtranszplantáción átesett betegek CYP3A-státusza

(*CYP3A5* genotípusa és *CYP3A4* expressziója) és a dózissal normalizált takrolimusz vérkoncentráció, valamint a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózisingény között. A takrolimusz kezdő dózisának (0,1 mg/testtömeg-kg) módosítása minden recipiens esetében szükséges volt. A takrolimusz dózis-módosítás mértéke a *CYP3A*-státusz ismeretében a következőképp alakult: 1.) A funkcionáló vad típusú *CYP3A5\*1* allélt hordozók esetében 140%-os dózis növelés (0,24 mg/testtömeg kg), 2.) a *CYP3A5\*3/\*3* genotípussal rendelkező átlagos *CYP3A4* mRNS expressziót mutató betegek esetében pedig 40%-os takrolimusz dózis növelésre (0,138 mg/testtömeg kg) volt szükséges a terápiás vérszint eléréséhez. 3.) A *CYP3A5* enzimhiányos és alacsony *CYP3A4* mRNS expressziót mutató recipienseknél a dózis 20%-os csökkentése (0,08 mg/testtömeg kg) volt célravezető a takrolimusz vérszint terápiás tartományban tartásához.

- Szívtranszplantáció után a műtétet követő 15 hónap során a *CYP3A4* mRNS expresszió és vele összefüggésben a takrolimusz metabolizáló kapacitás is a kortikoszteroid dozírozással korrelálva fluktuált a *CYP3A5* enzimet nem expresszáló betegeknél. A kezdeti magas kortikoszteroid dózissal, majd fokozatos csökkentésének és végül a visszavonásnak köszönhetően a *CYP3A4* mRNS expresszió az első hónap végéig jelentősen növekedett, amit egy további folyamatos emelkedés követett a műtétet követő hatodik hónapig, végül egy enyhe csökkenés volt megfigyelhető a szteroid visszavonást követően. Hasonlóképp a *CYP3A4* mRNS expresszió változásokhoz, a takrolimusz metabolizáló kapacitás is a kortikoszteroid dozírozással összefüggésben alakult a *CYP3A5* enzimet nem expresszáló betegeknél. A *CYP3A5\*1* allélt hordozó recipienseknél ezek az összefüggések nem voltak megfigyelhetők, mely különbség az egyes kortikoszteroid hatóanyagok szelektív indukciós hatására, valamint a *CYP3A5* enzim nagyobb takrolimusz metabolizáló affinitására vezethető vissza. Bár a takrolimusz terápiás gyógyszer szint monitorozása nem helyettesíthető a recipiensek *CYP3A* állapotának vizsgálatával, a *CYP3A*-státusz meghatározása segíthet a kezdeti takrolimusz dózis optimalizálásában, valamint megkönnyítheti a személyre szabott takrolimusz terápiát a szteroid dózis csökkentés és megvonás alatt a késői posztoperatív időszakban.

- A májtranszplantált betegek vizsgálata alapján kapott eredményeink alapján a máj graft *CYP3A5* expressziójának (a *CYP3A5\*1* allél jelenléte) fontos

szerepe megerősíthető a dózissal és testtömeggel normalizált takrolimusz vérkoncentrációk kialakításában; a recipiensek *CYP3A5* genotípusa azonban nem bizonyult statisztikailag szignifikáns tényezőnek. A májtranszplantáció során beültetett graft és a recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációjának a terápiás vérszint eléréséhez szükséges takrolimusz dózusra vonatkozó hatását külön is vizsgáltuk. A vérszintet befolyásoló hatáshoz hasonlóan, a dózusra gyakorolt hatás vizsgálata során is az szűrhető le az eredményekből, hogy a donor *CYP3A5* genotípusnak domináns szerepe van a megfelelő dózis megválasztásában, ugyanis magasabb testsúllyal normalizált dózis szükséges a kívánt vérszint eléréséhez akkor, ha a donor rendelkezik *CYP3A5* expresszióval.

Összegzésként elmondható, hogy a polimorf CYP allélok azonosítása és a betegek CYP expressziójára vonatkozó információ finomíthatja a személyre szabott gyógyszerelést, a megfelelő, pontos dozírozás megkönnyítésével, és megbecsülheti a terápiás koncentrációtartománytól való eltérés kockázatát.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke

1. Déri, M.T., Kiss, Á.F., Tóth, K., Paulik, J., Sárváry, E., Kóbori, L., Monostory, K. (2020) End-stage renal disease reduces the expression of drug-metabolizing cytochrome P450s. *Pharmacol Rep*, 72, 1695-1705. **IF: 3,024**
2. Csikány, N., Kiss, Á., Déri, M., Fekete, F., Minus, A., Tóth, K., Temesvári, M., Sárváry, E., Bihari, L., Gerlei, Z., Kóbori, L., Monostory, K. (2021) Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor *CYP3A*-status in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*, 87, 1790-1800. **IF:4,335\***
3. Déri M., Szakál-Tóth Zs., Fekete F., Mangó K., Incze E., Minus A., Merkely B., Sax B., Monostory K. (2021) *CYP3A*-status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients. *Sci Rep*, **IF: 4,379\***

### Disszertációtól független publikációk jegyzéke

4. Fekete, F., Mangó, K., Deri, M., Incze, E., Minus, A., Monostory, K. (2021) Impact of genetic and non-genetic factors on hepatic *CYP2C9* expression and activity in Hungarian subjects. *Sci Rep*, 11, 17081. **IF: 4,379\***

5. Gyimesi, M., Rauscher, A.A., Suthar, S.K., Hamow, K.A., Oravec, K., Lorincz, I., Borhegyi, Z., Deri, M.T., Kiss, A.F., Monostory, K., Szabo, P.T., Nag, S., Tomasic, I., Krans, J., Tierney, P.J., Kovacs, M., Kornya, L., Malnasi-Csizmadia, A. (2021) Improved Inhibitory and Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicology (ADMET) Properties of Blebbistatin Derivatives Indicate That Blebbistatin Scaffold Is Ideal for drug Development Targeting Myosin-2. *J Pharmacol Exp Ther*, 376, 358-373. IF: **4,030\***
6. Kiss, A., Menus, A., Toth, K., Deri, M., Sirok, D., Gabri, E., Belic, A., Csukly, G., Bitter, I., Monostory, K. (2020) Phenoconversion of CYP2D6 by inhibitors modifies aripiprazole exposure. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 270, 71-82. IF: **5,270**
7. Menus, A., Kiss, A., Toth, K., Sirok, D., Deri, M., Fekete, F., Csukly, G., Monostory, K. (2020) Association of clozapine-related metabolic disturbances with CYP3A4 expression in patients with schizophrenia. *Sci Rep*, 10, 21283. IF: **4,379**
8. Monostory, K., Nagy, A., Toth, K., Budi, T., Kiss, A., Deri, M., Csukly, G. (2019) Relevance of CYP2C9 Function in Valproate Therapy. *Curr Neuropharmacol*, 17, 99-106. IF: **4,668**
9. Kiss, A.F., Vasko, D., Deri, M.T., Toth, K., Monostory, K. (2018) Combination of CYP2C19 genotype with non-genetic factors evoking phenoconversion improves phenotype prediction. *Pharmacol Rep*, 70, 525-532. IF: **2,761**
10. Kovacs, T., Deri, M., Fulop, A., Palhazy, T., Hafra, E., Sirok, D., Kiss, A.F., Lotz, G., Szijarto, A., Monostory, K. (2018) Isoform-Dependent Changes in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism after Portal Vein Ligation in the Rat. *Eur Surg Res*, 59, 301-319. IF: **1,629**
11. Toth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, A., Hafra, E., Deri, M., Menus, A., Bitter, I., Monostory, K. (2017) Potential Role of Patients' CYP3A-Status in Clozapine Pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol*, 20, 529-537. IF: **3,981**
12. Toth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, A., Hafra, E., Deri, M., Menus, A., Bitter, I., Monostory, K. (2016) Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype. *Int J Neuropsychopharmacol*, 19,1-9. IF: **4,712**

\*Amennyiben a disszertációm megírása évében a folyóirat nem rendelkezett még aktuális impakt faktoral, úgy a folyóirat egy évvel korábbi impakt faktorát rögzítettem.

Első és társszerzős publikációim 2021.10.31-én összesített impakt faktora: **47,547**

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk 2021.10.31-én összesített impakt faktora: **11,738**