

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2672.

DÉRI MÁTÉ TAMÁS

Experimentális és klinikai farmakológia
című program

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Monostory Katalin, tudományos főmunkatárs

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

Doktori Értekezés

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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék	5
1 Bevezetés	7
2 Irodalmi áttekintés	8
2.1 Gyógyszer-metabolizmus	8
2.2 CYP enzimek	10
2.2.1 CYP enzimek általános bemutatása.....	10
2.2.2 CYP enzimek szerkezete, működése	13
2.3 A humán CYP enzimaktivitást befolyásoló tényezők	14
2.3.1 A humán CYP gének polimorfizmusa.....	14
2.3.2 A humán CYP enzim expresszió indukciója	16
2.3.3 A humán CYP enzim expresszió szuppressziója.....	18
2.3.4 A humán CYP enzimek gátlása	19
2.4 A gyógyszer-metabolizmus és a CYP enzimek jelentősége a klinikai gyakorlatban.....	21
2.4.1 CYP enzim expresszió és aktivitás jelentősége végstádiumú vesebetegség esetén	21
2.4.2 Szervtranszplantáció	23
2.4.3 A szív-és máj transzplantáció rövid bemutatása	24
2.4.4 Transzplantációt követő immunszuppressziós terápia	25
2.4.5 Kalcineurin inhibitorok	28
2.4.6 CYP3A enzimek szerepe az immunszuppresszánsok metabolizmusában	30
3 Célkitűzések	32
4 Módszerek	34
4.1 CYP mRNS expresszió mérési módszer optimalizációja	34

4.1.1	Vérminták.....	34
4.1.2	Leukocita izolálás.....	34
4.1.3	RNS izolálás.....	35
4.1.4	Reverz Transzkripció.....	35
4.1.5	Relatív mRNS expresszió mérés kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR).....	36
4.2	Végstádiumú vesebetegek és egészséges vesefunkcióval rendelkező szervdonorok CYP mRNS expressziójának értékelése.....	37
4.3	A CYP3A-státusz összefüggése a takrolimusz vérkoncentrációval és dózisigénnel szívatültetett betegeknél.....	37
4.3.1	Szívatültetett betegek.....	37
4.3.2	Immunszuppresszáns terápia és takrolimusz vérszint monitorozás szívtanszplantált betegeknél.....	38
4.3.3	A szívatültetett betegek CYP3A-státuszának meghatározása.....	39
4.3.4	A szívatültetett betegek CYP3A-státuszának és a takrolimusz kezelés összefüggéseinek értékelése.....	42
4.4	A donor és recipiens <i>CYP3A5</i> genotípus meghatározásának klinikai jelentősége májtranszplantált betegeknél.....	42
4.4.1	Májtranszplantált betegek.....	42
4.4.2	A donor máj graftok és a recipiensek CYP3A-státuszának megállapítása.....	43
4.4.3	Immunszuppresszáns terápia és takrolimusz vérszint meghatározás májtranszplantált betegeknél.....	43
4.4.4	A donor/recipiens <i>CYP3A5</i> genotípus hatásának értékelése a takrolimusz farmakokinetikai paraméterek alakulására májtranszplantált betegeknél.....	44
5	Eredmények.....	45
5.1	CYP mRNS expresszió mérési módszer optimalizálása.....	45
5.1.1	Folyadék-folyadék RNS extrakciós módszerek összehasonlítása.....	45
5.1.2	A reverz transzkripció és a qPCR módszer optimalizálása.....	46

5.2	CYP mRNS expresszió végstádiumú vesebetegeknél	51
5.3	A CYP3A-státusz kapcsolata a takrolimusz vérkoncentrációval és dóziséigénnyel szívátültetett betegeknél.....	53
5.3.1	A szívtranszplantált betegek CYP3A-státusza	53
5.3.2	A szívátültetett betegek CYP3A-státusza és a takrolimusz expozíció összefüggései a korai posztoperatív időszakban	56
5.3.3	A CYP3A4 mRNA expresszió és a takrolimusz expozíció időfüggése a szívtranszplantációt követő 15 hónapban	60
5.4	A donor és recipiens <i>CYP3A5</i> genotípus meghatározásának klinikai jelentősége májtranszplantált betegeknél.....	63
6	Megbeszélés.....	67
6.1	A CYP génexpresszió mérési módszer optimalizációja alacsony expresszió kimutatására	68
6.2	A CYP3A-státusz hatása a takrolimusz vérkoncentrációra, valamint a dóziséigényre szívtranszplantált betegeknél.....	73
6.3	Májtranszplantált recipiensek és a donorok <i>CYP3A5</i> genotípus meghatározásának klinikai jelentősége.....	78
7	Következtetések.....	81
8	Összefoglalás	84
9	Summary.....	85
10	Irodalomjegyzék	86
11	Saját publikációk jegyzéke	110
11.1	Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke.....	110
11.2	Disszertációtól független publikációk jegyzéke	110
12	Köszönetnyilvánítás	112
13	Függelék	114

Rövidítésjegyzék

ADH: alkohol dehidrogenáz

AFB1: aflatoxin B1

BHQ: „black hole quencher”

C₀: C_{min}, mélykoncentráció („trough concentration”)

CAR: konstitutív androsztán receptor

cDNS: RNS szekvenciára komplementer DNS szekvencia

Cq: kvantifikációs ciklus

CYP: citokróm P450 enzim

D: dózis

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FAM: fluoreszcein amidit

FDA: Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerügyi hatósága „U.S. Food and Drug Administration”

GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GFR: glomerulus filtrációs ráta

HEX: hexakloro-fluoreszcein

IL: interleukin

KDIGO: „Kidney Disease Improving Global Outcome” globális nonprofit organizáció

K_m: (Michaelis-Menten állandó)

MDR1: multidrog rezisztencia fehérje 1 (P-glikoprotein)

miRNS: mikro RNS

mTOR: „mammalian target of rapamycin”

NADH: α-nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH: α-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF-κB: nukleáris faktor kappa-B

OATP: szerves anion transzporter fehérje

OVSZ: Országos Vérellátó Szolgálat

PCR: polimeráz láncreakció

P-gp: P-glikoprotein (multidrog rezisztencia fehérje 1)

PXR: pregnán X receptor

qPCR: kvantitatív PCR

RXR: retinoid X receptor

SD: szórás (standard deviation)

SNP: egy pontos nukleotid polimorfizmus („single nucleotide polymorphism”)

TNF- α : tumor nekrozis faktor- α

Vmax: maximális reakciósebesség

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 gyógyszerkészítményekből 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 [Handschin & Meyer 2003, Nakata et al. 2006, Sukhanov & Piruzyan 2010].

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 [Guengerich 2003, Guengerich 2006, Turner et al. 2015]. Az optimális gyógyszerhatás elérése érdekében nem elegendő a hatóanyagok hatásmechanizmusával foglalkozni (farmakodinámiás folyamatok), hanem elengedhetetlen a hatóanyagok farmakokinetikai vizsgálata, illetve a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének jellemzése, amely alapját képezheti a személyre szabott gyógyszeres terápiának [Tucker 2017, Wilkinson 2005]. Dolgozatomban a gyógyszer-metabolizmusban mutatkozó egyének közti eltérésekkel fogok részletesebben foglalkozni.

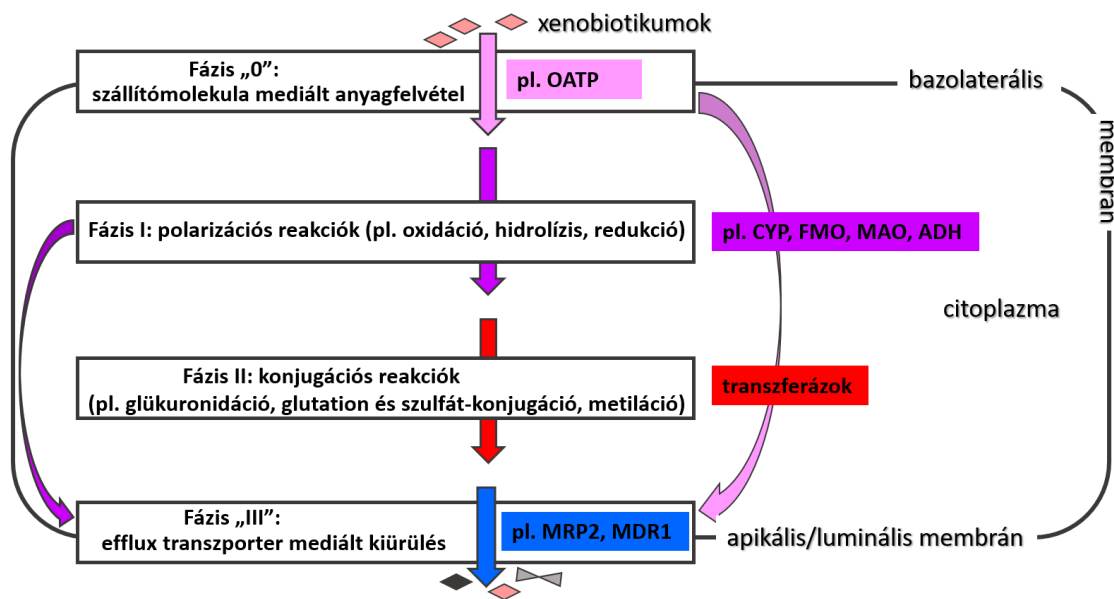
2 Irodalmi áttekintés

2.1 Gyógyszer-metabolizmus

A xenobiotikumok eltávolítása a szervezetből többnyire a vesén keresztül a vizelettel, vagy az epén keresztül a széklettel történik, azonban egyes anyagok exkréciója nyállal, verejtékkel, a kilélegzett levegővel és az anyatejjel is bekövetkezik. A kiválasztást gyakran (de nem minden esetben) enzimatisz átalakulás, a gyógyszer-lebontó enzimek által végzett metabolizmus előzi meg [Maddison et al. 2008, Taft 2009], amelyet más néven biotranszformációnak is nevezünk. Az átalakulás során a vegyületek vízdékonysága általában növekszik, a képződött metabolitok könnyebben kiürülnek a szervezetből. A biotranszformáció többnyire a farmakológiai hatás csökkenéséhez vagy megszűnéséhez vezet, azonban képződhet az anyavegyülettel azonos hatású, aktív metabolit is (erre kiváló példa a takrolimusz metabolizmusa) [Iwasaki 2007]. Van olyan gyógyszer-vegyület, amely nem, vagy csak kisebb mértékben rendelkezik terápiás hatással a keletkezett metabolithoz viszonyítva (aktív metabolit). Erre a folyamatra jó példa a kodein enzimatisz aktiválása (CYP2D6 enzim), melynek eredményeként jön létre az erős analgetikus hatással bíró morfin [Zanger & Schwab 2013]. A jelenséget bioaktivációnak nevezzük, a kiindulási gyógyszer-vegyületet pedig 'prodrug'-nak [Huttunen et al. 2011]. A xenobiotikumok bioaktivációjának következtében azonban farmakológiai szempontból nézve nemcsak aktív metabolitok, hanem káros anyagok (pl. citotoxikus vagy karcinogén molekulák) is képződhetnek. Az egyik ismert példa a láz és fájdalomcsillapító paracetamol vagy más néven acetaminofen, melynek túladagolása esetén a CYP (citokróm P450) enzimek aktivitásának köszönhetően keletkező reaktív metabolit, az *N*-acetyl-*p*-benzokinonimin (NAPQI) a semlegesítő konjugációs kofaktorok depléciója következtében a fehérjék -SH csoportjaihoz kovalensen kötődik, ezzel pedig a sejtek - elsősorban a hepatociták károsodását okozza [Hazai et al. 2002]. A bioaktiváció karcinogén folyamatokat indukáló mechanizmusára egy nevezetes példa a gabonaféléken előforduló mikotoxin, a prokarcinogén aflatoxin B1 (AFB1). A főleg a CYP3A4 enzim által katalizált AFB1 *exo* 7,8-epoxidációja komoly kromoszómális károsodást eredményezhet az *exo* epoxid reaktív DNS kötése és interkalációja miatt [Guengerich 2006, Zhou et al. 2009].

A xenobiotikum metabolizmus kémiai reakcióit a szakirodalom klasszikusan két típusba sorolja. Az ún. Fázis I típusú reakciók (oxidáció, hidrolízis, redukció) a szervezetbe jutó

idegen anyagok polaritását fokozzák, ezzel az anyagok vízoldékonysága is növekszik, mely a kiürülést segíti elő. A Fázis II reakciók során a vegyületek, vagy gyakran a már előzetesen polárosabbá vált metabolitok konjugációs reakciói (pl. glükuronidáció, glutation-, szulfát-konjugáció, metiláció, *N*-acetiláció, aminosav konjugáció stb.) játszódnak le [Leucuta & Vlase 2006, Wilkinson 2005]. A polárosabbá vált termékek már könnyebben kijutnak a sejtől, így a szervezetből való kiürülésük gyorsabban végbe mehet. A sejtekből transzporter fehérjéken keresztül történő 'efflux' anyagáramlást egyes szerzők Fázis III folyamatoknak nevezik [Nakata et al. 2006]. A három fázisú megközelítést még egy ún. „0.” fázissal, az „uptake” transzporttal kiegészítve egy 4 fázisból álló átfogó anyagforgalmi képet kapunk a sejtek anyagfelvételétől a kiürüléséig [Döring & Petzinger 2014] (1. ábra).

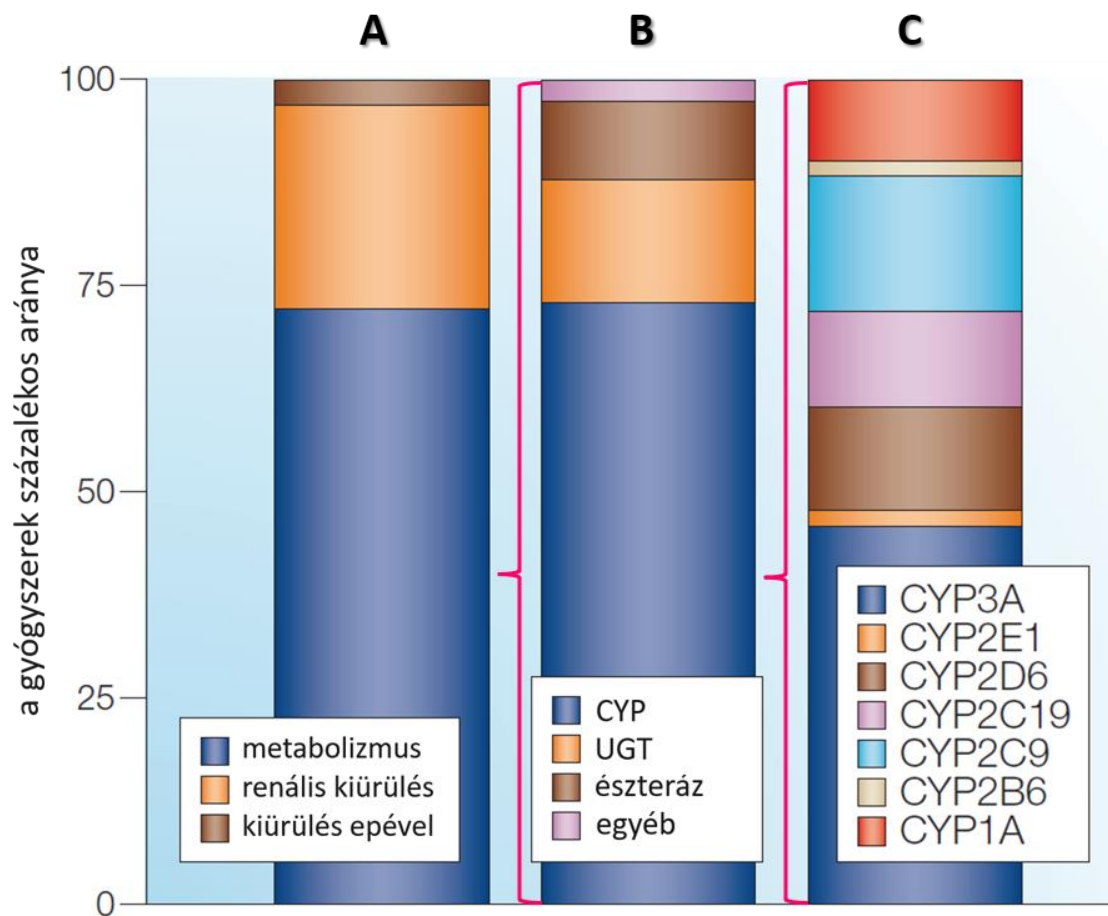


1. Ábra Xenobiotikumok (gyógyszerek és egyéb kémiai anyagok) metabolizmusának és kiürülésének vázlata. Az ábra egy hepatocita vázlatos megjelenítésével mutatja be a xenobiotikum elimináció lépéseit. OATP: szerves anion transzporter fehérje, CYP: citokróm P450, FMO: flavin monooxigenáz, MAO: monoamin-oxidáz, ADH: alkohol dehidrogenáz, MRP2: multidrogt rezisztenciához társuló fehérje 2, MDR1: P-glikoprotein/ multidrogt rezisztencia fehérje 1. Döring és Petzinger ábrája alapján [Döring & Petzinger 2014]

2.2 CYP enzimek

2.2.1 CYP enzimek általános bemutatása

A Fázis I reakciókban résztvevő enzimek (CYP enzimek, flavin monooxygenázok, monoamin oxidázok, alkohol dehidrogenázok, aldehid dehidrogenázok, epoxid hidrolázok stb.) közül a CYP enzimesalád szerepe a legjelentősebb a gyógyszer-metabolizmusban (2. ábra) [Nakata et al. 2006, Wienkers & Heath 2005, Wilkinson 2005].

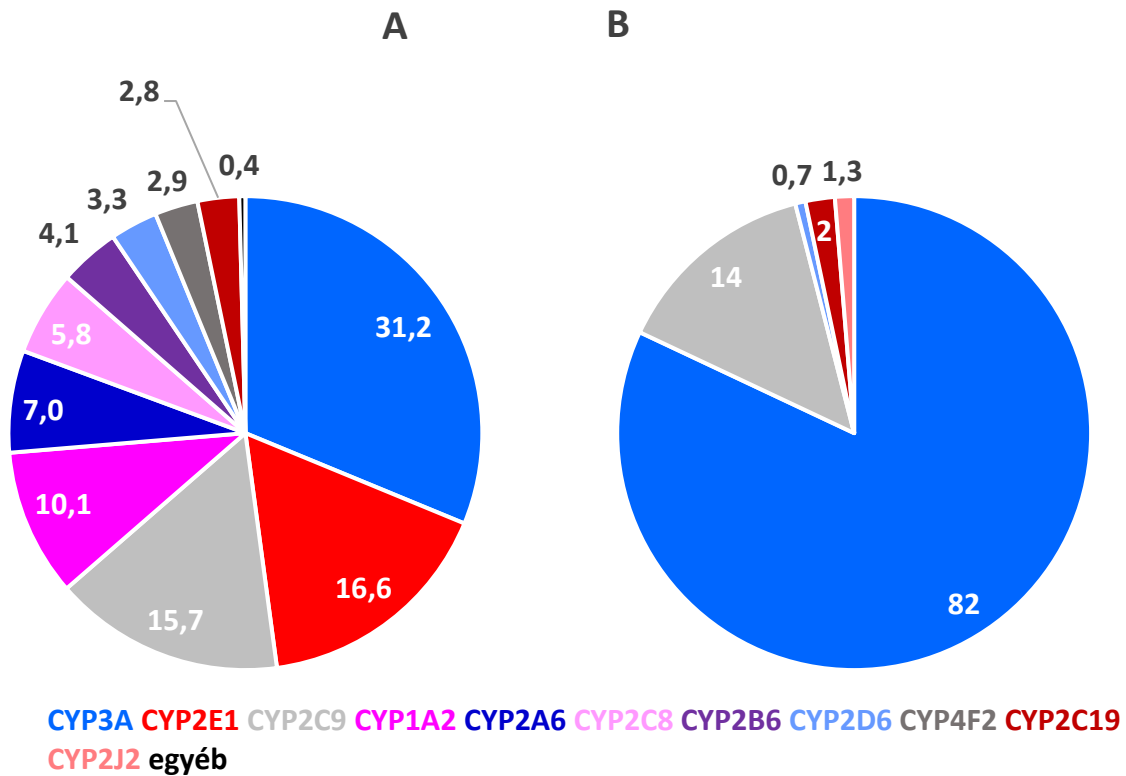


2. Ábra A 200 leggyakrabban felírt gyógyszer eliminációja (2002-es adat), **A**: eliminációs utak, **B**: Metabolizmust katalizáló enzim (szuper) családok, **C**: CYP függő metabolizmus megoszlása az egyes enzimek közt. Wienkers és Heath ábrája alapján [Wienkers & Heath 2005]

A CYP enzimesalád a múlt század közepén a hatóanyagok metabolizmus vizsgálatainak köszönhetően került be a kutatások látóterébe. Először patkány és sertés májból izolált mikroszóma frakciókból írták le, mint elkülönülő pigment (P) frakciót, [Garfinkel 1958, Klingenberg 1958]. Ezt a frakciót néhány évvel később már P450 névvel említi a

szakirodalom a redukált enzimfehérje CO-dal képzett komplexének 450 nm-es fényelnyelési maximuma alapján [Omura & Sato 1962]. A „Cytochrome” és a P450 jelölésekből alakult ki a napjainkban általánosan használt CYP rövidítés. Az egyes CYP enzimeket az aminosav szekvenciájuk homológiája alapján osztályozzák. Főszabály alapján a legalább 40% szekvencia azonossággal rendelkező enzimeket egy családba soroljuk és a CYP rövidítés után arab számmal jelöljük (pl. CYP2), 55%-os homológia felett pedig az enzimek egy alcsaládba tartoznak és nagy betűvel jelöljük (pl. CYP2C) [Nelson 2006]. Végül az utolsó számmal az adott enzimet jelezzük (pl. CYP2C9).

A CYP enzim szupercsalád széles körben elterjedt az egész élővilágban, az élőlények mind az 5 fő rendszertani csoportjában (országában) megtalálhatók. A CYP gének száma akár több százszoros különbséget is mutathat a fajok között, például míg a hasadó élesztőgomba (*Schizosaccharomyces pombe*) genomja 2, a házi egér (*Mus musculus*) genomja 103, addig a szójabab (*Glycine max*) genomja 332 CYP gént tartalmaz. A humán genom 18 CYP enzimcsaládjára 57 CYP fehérje kódoló gént és 65 pszeudogént tartalmaz [Nelson 2009, Nelson et al. 2013, Nelson & Nebert 2018]. Az eukarióta CYP enzimek túlnyomó többsége membránhoz kötődve a sima felszínű endoplazmatikus retikulumban, valamint a mitokondriumban található. A humán xenobiotikum/gyógyszer metabolizmusban elsősorban a CYP1, CYP2 és CYP3 enzimcsalád tagjai vesznek részt [Almazroo et al. 2017, Nelson & Nebert 2018]. Emberben a CYP enzimek által katalizált metabolizmus főleg a májban, valamint a vékonybél falában zajlik, azonban a tüdőben, agyban és a vesében is fejeződnek ki gyógyszer-metabolizáló CYP-ek számottevő mennyiségben [Almazroo et al. 2017, Wilkinson 2005]. A májban legnagyobb mértékben a CYP3A4, CYP2C9, CYP2E1 és a CYP1A2 enzimek expresszálódnak (3. ábra). A CYP3A4, CYP2C9 és CYP1A2 enzim nemcsak a magas expresszió miatt, hanem széles szubsztrát specificitásuknak köszönhetően is kiemelkedő szerepet játszik a gyógyszer metabolizmusban [Achour et al. 2014, Zanger & Schwab 2013]. A CYP2D6 és CYP2C19 enzim is meghatározó szerepet tölt be a gyógyszer-metabolizmusban annak ellenére, hogy a májban igen alacsony koncentrációban (2-3%) expresszálódnak.



3. *Ábra.* CYP enzimek százalékos aránya a humán májban (A) és a vékonybélben (B). Achour és munkatársai, valamint Paine és munkatársai publikációi alapján [Achour et al. 2014, Paine et al. 2006]

A CYP enzimek emlősökben különösen sokrétű szerepet töltenek be az endogén oxidatív, peroxidatív és redukív folyamatok katalizálásával; részt vesznek például a koleszterin és a tromboxán A₂, valamint zsírsavak, szteroidok, retinoidok, vitamin származékok, epesavak, porfirinek, prosztaciklinek, eikozanoidok és egyéb lipidmediátorok metabolizmusában is. A CYP enzimek azonban nemcsak endogén komponensek átalakításában játszanak szerepet, hanem a testidegen vegyi anyagokat is átalakítják - beleértve a gyógyszereket, növényvédő szereket, táplálékkiegészítőket, számtalan környezeti szennyező anyagot, természetes növényi termékeket, sőt még a bél mikrobiomjából származó bakteriális metabolitokat is [Nelson & Nebert 2018]. A specifikusan CYP génekre vonatkozó repozitóriumot a <https://drnelson.uthsc.edu/> weboldalon lehet elérni.

2.2.2 CYP enzimek szerkezete, működése

Eddigi ismereteink szerint a CYP enzimek szerkezete meglehetősen konzervatív, valamint az enzimesalád egyediségét támasztja alá, hogy nincs olyan, hemet nem tartalmazó enzim, mely hasonló konformációval rendelkezne, mint a CYP enzimek. A polipeptid legkonzervatívabb részei az enzim aktív helyénél, a hem prosztetikus csoport körül elhelyezkedő másodlagos fehérjeszerkezettel rendelkező szakaszok [Poulos & Johnson 2015]. A CYP enzimeket a természet legsokoldalúbb biokatalizátorainak tekintik, a leggyakoribb CYP katalizált reakciótípus az oxidáció; a CYP enzimek több mint 20 különböző típusú kémiai oxidációs reakcióban vesznek részt, beleértve az aromás és alifás hidroxilezést, az epoxid képződést, a dekarboxilezést, az *N*- *O*- és *S*-dealkilációt, *N*- és *S*-oxidációt. Az oxidációs reakciókon túl redukációs reakciók katalizálásában is vesznek részt CYP enzimek. Jó példa ez utóbbira az antikonvulzív klonazepam enzimatis nitroredukciója, mely során primer metabolitként 7-aminoklonazepam keletkezik [Li et al. 2020, Munakata & Tsuchiya 2008]. A CYP enzimek szubsztrát specifitása meglehetősen széles, azaz egy enzim több különböző szubsztrátot képes átalakítani és többféle reakciót is képes katalizálni, illetve átfedő, vagyis egy adott reakciót több különböző CYP enzim is katalizálhat [Zanger et al. 2008].

A CYP enzimek működéséhez szükség van molekuláris oxigénre, NADPH-ra (α -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát), valamint az elektrontranszportot biztosító NADPH-citokróm P450-oxidoreduktázra. Egyes CYP enzimek NADH-ról (α -nikotinamid-adenin-dinukleotid) a NADH-citokróm b5 reduktáz, valamint a citokróm b5 enzimen keresztül is képesek elektront fogadni [Hannemann et al. 2007, Li et al. 2020]. Az általános reakció séma alapján a szubsztrát először a CYP enzim nyugalmi állapotú ferri (Fe^{3+}) ionjához pozícionálódik, ezzel a lépéssel kiszorítva az aktív helyen lévő vízmolekulát. A szubsztrát bekötődése megkönnyíti a ferri vas Fe^{2+} (ferro) vassá történő redukcióját. Az elektron-átmenetet a NADPH-ról a NADPH-citokróm P450-oxidoreduktáz biztosítja, a redukció pedig már lehetővé teszi a molekuláris oxigén vashoz való kötődését. Ezt követően egy második elektron felvétel redukálja a dioxigén ferro átmeneti állapotot, melyet a vashoz nem kötődött oxigén atom proton felvétele követ, így a molekuláris oxigén egyik atomja víz formájában távozik. A következő lépések során a molekuláris oxigén másik atomja beépül a szubsztrátba, felszabadul a hidroxilált termék

és egy víz molekula koordinációjával az enzim visszanyeri nyugalmi állapotát [Li et al. 2020, Shebley et al. 2009].

2.3 A humán CYP enzimaktivitást befolyásoló tényezők

Az emberi gyógyszer-metabolizmus nagy egyéni (inter- és intra-individuális) variabilitást mutat, mely több tényezőre vezethető vissza: a genetikai polimorfizmus mellett a nem-genetikai faktoroknak köszönhető enzim expresszió változás (indukció/szuppresszió), valamint a közvetlenül az enzimfehérjét befolyásoló gátló mechanizmusok is jelentősen befolyásolhatják a gyógyszer-metabolizáló képességet [Klomp et al. 2020, Song et al. 2021]. Az egyes enzimek expressziójának mértéke sok esetben nagyságrendi eltéréseket mutathat időben egy egyénen belül, vagy az egyének között [Zanger & Schwab 2013, Zanger et al. 2008].

2.3.1 A humán CYP gének polimorfizmusa

A gyógyszer-metabolizáló kapacításban mutatkozó interindividuális különbségek számos esetben a nagyfokú genetikai polimorfizmusra vezethetők vissza. A CYP gének leggyakrabban pontmutációt, más néven SNP-t (egy pontos nukleotid polimorfizmus /"Single Nucleotide Polimorphism") hordoznak, amely egy bázis kicserélődését vagy delécióját/inszercióját jelenti. A mutáció a genetikai kód degeneráltsága miatt sokszor nem manifesztálódik a fenotípusban [Martiny & Miteva 2013, Zhou et al. 2009], esetenként azonban csökkent enzim aktivitáshoz, illetve teljes enzimhiányhoz, vagy fokozott expresszióhoz, ezáltal pedig emelkedett enzimaktivitáshoz is vezethet. Az inszerció és deléció szerencsés esetben csak aminosav kiesést, vagy extra beépülést okoz a polipeptid láncban, egy esetleges frameshift mutáció azonban az enzim vagy funkciója teljes hiányát is okozhatja (1. táblázat). Az egyes gének teljes hiánya vagy többszöröződése (multiplikációja) fontos fenotípusbeli különbségek forrása lehet [Meyer 2004, Zanger & Schwab 2013, Zhou et al. 2009]. Bizonyos CYP enzimek (pl. CYP2D6, CYP2C19) az emberben oly nagymértékben polimorf megjelenésűek, hogy külön gyógyszertervezési feladat olyan hatóanyagok bevezetése, melyek ezen polimorf CYP enzimektől függetlenül, vagy csak részben rajtuk keresztül metabolizálnának [Bienfait et al. 2021, Guengerich 2003]. Érdekes és egyben klinikailag jelentős eloszlás figyelhető meg a fontos gyógyszer-metabolizáló szereppel bíró enzim, a CYP3A5 két legelterjedtebb allélvariánsa a *CYP3A5*1* és a *CYP3A5*3* közt.

Az allél-gyakoriságokban igen markáns földrajzi-demográfiai eltérés rajzolódik ki. Az ősínek tartott, vad allélnak nevezett *CYP3A5*1* szekvencia az afrikai kontinens szub-szaharai részén, illetve az afroamerikai származású populációkban uralkodó allél-gyakorisággal rendelkezik. A jelenség hátterében valószínűleg a *CYP3A5* enzim kortizol metabolizmusban betöltött szerepe állhat, ugyanis a kortizol részt vesz a vese só és vízvisszatartásának szabályzásában, melynek a forró éghajlati viszonyok közt kitüntetett jelentősége van. A világ többi részén a funkcióvesztő mutációt kódoló *CYP3A5*3* allél az elterjedtebb, legnagyobb allél-frekvenciával az európai populáció rendelkezik, melyben szinte már rögzült a polimorfizmus [Bains 2013, Bains et al. 2013]. Egy 2017-ben publikált, populáció szintű szekvenálási adatokat feldolgozó metaanalízis a különböző populációk *CYP3A5*3* allél-frekvenciájára vonatkozóan az alábbi értékeket közölte: kaukázusi: 94,3%, afrikai: 18%, kelet-ázsiai: 71,3%, dél-ázsiai: 66,8%, és (heterogén) amerikai: 79,7 % [Zhou et al. 2017]. A gyógyszertervezésen felül a klinikai gyakorlatba is beépült a terápiás szempontból jelentős genetikai variánsok figyelembevétele a gyógyszeres kezelések során. A CYP enzimek meghatározó gyógyszer-metabolizáló szerepét és ezzel együtt az enzimekre jellemző nagyfokú polimorfizmus klinikai jelentőségét jól illusztrálja az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA) által rögzített adatbázis (<https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>), mely 2015-ben még csak 157 farmakogenetikai biomarker alapú ajánlást tartalmazott, melynek közel 40%-a CYP génekre vonatkozott [Fujikura et al. 2015]. Napjainkban ez az adatbázis már 457 gyógyszer-alkalmazási ajánlást tartalmaz, melynek több mint 25%-a CYP enzimekkel kapcsolatos.

1. Táblázat Néhány, klinikai következményekkel járó CYP polimorfizmus. Az enzim neve után látható * motívum és az azt követő szám az allélvariáns azonosítója. A vad típusként számoltartott szekvencia a „*1” jelzést viseli. Zanger és Schwab közleménye alapján [Zanger & Schwab 2013]

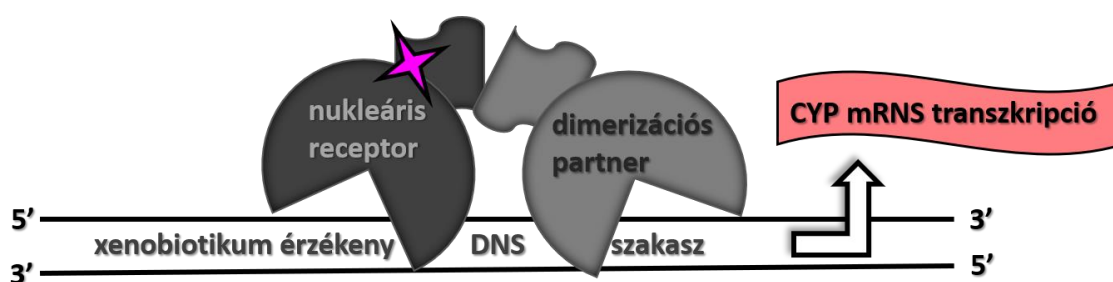
Allélvariáns	Mutáció pozíciója (azonosítója)	Transzkripcióra és translációra gyakorolt hatás	Allél-gyakoriság az európai populációban	Funkcionális hatás
<i>CYP2C9</i> *2	3608C>T (rs1799853)	R144C	10–17%	csökkent enzim aktivitás
<i>CYP2C9</i> *3	42614A>C (rs1057910)	I359L	6%	erősen csökkent enzim aktivitás
<i>CYP2C19</i> *2	19154G>A (rs4244285)	intron kivágódási defektus	6-15%	nincs expresszió
<i>CYP2C19</i> *3	17948G>A (rs4986893)	W212X	0-1%	nincs expresszió
<i>CYP2D6</i> *1xn	rekombináció	gén multiplikáció	1-9%	fokozott expresszió és aktivitás
<i>CYP2D6</i> *3	2549delA (rs35742686)	olvasási keret eltolódás (frameshift)	~1%	nincs expresszió
<i>CYP2D6</i> *4	1846G>A rs3892097	intron kivágódási defektus	15-25%	nincs expresszió
<i>CYP2D6</i> *5	rekombináció	gén deléció	3-6%	nincs expresszió
<i>CYP2D6</i> *6	1707delT (rs5030655)	olvasási keret eltolódás (frameshift)	~1%	nincs expresszió
<i>CYP3A5</i> *3	6986A>G (rs776746)	intron kivágódási defektus	88-97%	nincs enzim aktivitás

2.3.2 A humán CYP enzim expresszió indukciója

A CYP enzimek genetikai polimorfizmusa csak részben ad magyarázatot a gyógyszer-metabolizmusban mutatkozó egyéni különbségekre. A CYP gének transzkripciójának indukciója, szuppressziója vagy a CYP enzimek gátlása (működésének csökkenése vagy megszűnése) metabolikus gyógyszer-interakciót eredményez. 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). Az expresszió és/vagy az aktivitás változása így a CYP genotípus fenokonverziójához vezet [Klomp et al. 2020, Shah & Smith 2015].

Indukció hatására növekszik a CYP enzimek expressziója, melynek következtében az enzimszint, valamint az enzimaktivitás is megnövekedik. Xenobiotikumok, vagy egyes endogén anyagok (pl. hormonok) hatására bekövetkező fokozott CYP gén transzkripció

receptor-függő folyamat, valamely nukleáris receptor aktivációjával jön létre. A nukleáris receptor alaphelyzetben a citoszolban található fehérjékkal asszociáltan, az asszociált fehérjék megakadályozzák a receptor sejtmagba történő belépését. Ha induktor jelenik meg a sejtben, közvetlenül kötődik a receptorhoz vagy szignál transzdukcióval aktiválja azt, mely így belép a sejtmagba. A nukleáris receptor a sejtmagban a megfelelő dimerizációs partnerhez kapcsolódva kötődik az adott gén promóter régiójában található nukleáris receptor felismerő helyre indukálva ezzel a CYP gén transzkripcióját (4. ábra) [Honkakoski et al. 2003, Monostory & Pascussi 2008].



4. Ábra. Nukleáris receptorok szerepe a CYP indukcióban. A rózsaszín csillag a nukleáris receptorhoz kötött xenobiotikum ligandot jelzi. Tamási és munkatársai ábrája alapján [Tamási et al. 2003]

Számos, a CYP1-3 családba tartozó gén átíródását befolyásolják a nukleáris receptorok. Az alábbiakban (2. táblázat) néhány példával bemutatom, hogy az egyes CYP gének expressziójának szabályzásában mely receptorok töltenek be kulcsszerepet.

2. Táblázat Néhány, a drog metabolizmus szempontjából fontos nukleáris receptor és az általuk szabályozott CYP gének. Monostory és Pascussi közleménye alapján [Monostory & Pascussi 2008].

CYP expressziót szabályzó receptor	célgén
AhR (Aromás szénhidrogén Receptor)	<i>CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1</i>
PXR (Pregnán X Receptor)	<i>CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4</i>
CAR (Konstitutív Androsztán Receptor)	<i>CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4</i>
GR (Glükokortikoid Receptor)	<i>CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4</i>

Az ún. CYP indukciós válasz gyógyszer-interakciók következtében alakulhat ki és befolyásolhatja a CYP függő gyógyszer-metabolizmust, ezzel pedig hatást gyakorol a

gyógyszerek farmakokinetikai és toxikológiai viselkedésére. A gyógyszeres kezelés során emelkedett CYP enzimszintek következtében az adott gyógyszer metabolizmusa fokozódik, emiatt előfordulhat, hogy a vérszint nem éri el a terápiás koncentráció tartományt és a várt gyógyszerhatás elmarad. Vagy épp ellenkezőleg, prodrug hatóanyagok alkalmazása esetén a CYP indukció miatt bekövetkező gyógyszer interakció fokozott gyógyszerhatást, mellékhatásokat is eredményezhet. Ilyen esetekben az adott gyógyszer dózisát módosítani kell, a vérszint rendszeres monitorozása pedig segíthet a megfelelő dózis beállításában [Hukkanen 2012, Jiang et al. 2012, Tompkins & Wallace 2007]. Egy klasszikus példa az enzim indukció okozta klinikai problémára az orbáncfű készítmények, valamint a kalcineurin inhibitor ciklosporin és takrolimusz hatóanyagok interakciója. Az orbáncfű készítmények fogyasztása a CYP3A4 enzim és a P-glikoprotein (P-gp) efflux transzporter indukciójához vezet, amelynek hatására a kalcineurin inhibitorok felszívódása a bélből csökken, valamint a májban történő metabolizmusa fokozódik. Az indukció következtében a graft működés szempontjából esszenciális immunosuppresszáns hatóanyag vérszintje lecsökken, melynek kritikus következményei (a beültetett szerv kilökődése) lehetnek [Borrelli & Izzo 2009]. Az enzimindukció általában késleltetett hatású, dózis függő folyamat és az indukciós hatás is lassan szűnik meg az induktor vegyület eliminációja után, hiszen enzimfehérje szintézis, illetve lebomlás játszódik le [Hukkanen 2012, Tompkins & Wallace 2007].

2.3.3 A humán CYP enzim expresszió szuppressziója

Az emberi gének szabályzásában, az indukció mellett az expresszió aktív csökkentése (szuppresszió) is alapvető szerepet tölt be. Egy jó példa erre a gyulladási folyamatok eredményeképp csökkenő CYP3A4 mRNS transzkripció. Inflammatórikus folyamatok során lipopoliszacharid (LPS) expozíció és/vagy TNF- α (tumor nekrosis faktor- α) felszabadulás következtében megnő az NF- κ B (nukleáris faktor kappa-B) expressziója. Egy 2006-os tanulmányban kimutatták, hogy a fokozott expressziót mutató NF- κ B sejtmagi transzlokációját követően az RXR (retinoid X receptor) receptor kötésével képes megbontani az aktív heterodimer nukleáris receptor PXR-RXR komplexet, mely így nem képes a célgénnek (pl. *CYP3A4*) transzkripcójának aktiválására, a folyamat eredőjeként tehát a célgénnek szuppressziója valósul meg [Gu et al. 2006]. Epigenetikai hatások is, mint például a mikro RNS-ek (miRNS) is csökkenthetik a CYP gének expresszióját akár közvetlenül vagy közvetetten. Direkt mechanizmus esetén a miRNS-ek a CYP gének

szabályzó régiójához, indirekt esetben pedig a CYP transzkripciót indukáló nukleáris receptorok szabályzó régiójához kötnek, mindkét esetben a CYP gén expressziójának csökkenését eredményezve (pl. *CYP3A4*: miRNA-27b, PXR receptor gén/*NR1I2*: miR-148a) [Kim et al. 2014]. Az *in vitro* és *in vivo* rendszerben is leírt, inflammatorikus citokinek (pl.: IL-6) által közvetített CYP3A szuppressziót a Megbeszélés rész 6.2 alfejezetében a 75. oldalon fogom részletesebben tárgyalni [Dickmann et al. 2012, Enokiya et al. 2021].

2.3.4 A humán CYP enzimek gátlása

A klinikai alkalmazás és a gyógyszer-fejlesztés során is lényeges feltárni a gyógyszer-hatóanyagok CYP enzim gátló sajátosságait. Azáltal, hogy egy gyógyszer-hatóanyag csökkenti a gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek aktivitását, a nem-kívánt mellékhatások fokozott megjelenését, esetenként komoly egészségkárosodást okozhat. Szemben az enzimindukációval, az enzimgátlás azonnal éreztetheti hatását, ugyanis közvetlenül az enzimfehérje működését befolyásolja. A gyógyszer-vegyületeken kívül a táplálékkal, valamint egyéb gyógyászati szerek alkalmazása során kerülhetnek a szervezetbe specifikus CYP gátló molekulák. CYP enzim inhibitor vegyületek találhatók például a grépfrútban (*Citrus x paradisi*), melyek jelenléte nagyban befolyásolhatja a klinikai gyógyszeres terápia kimenetelét (CYP3A4 gátlás: 6'-7'-dihidroxibergamottin, bergamottin) [Girenavar et al. 2007, Seden et al. 2010].

Az enzimkatalízis gátlásának két alapvetően különböző módja létezik: a reverzibilis és az irreverzibilis gátlás. A reverzibilis gátlás egyik változata a kompetitív gátlás, amelynek során a szubsztrátok versengenek az enzim aktív helyéért. A reakcióban részt vevő anyagok metabolizmusának sebességét az egyes szubsztrátok koncentrációja, valamint az enzim aktívhelyéhez való kötődés erőssége határozza meg. Kompetitív gátlás esetén a V_{max} (maximális reakciósebesség) nem változik csak a K_m (Michaelis-Menten állandó) nő meg, tehát nagy koncentrációjú szubsztrát jelenlétében a gátlás nem igazán jut érvényre. Reverzibilis nem-kompetitív gátlás során a gátlószer nem a katalitikus helyhez kötődik, hanem egy másik pozícióban, allosztérikus módon konformáció változást indukál az aktív helyen, ezáltal csökkentve a szubsztrát termékké alakulásának sebességét. A nem-kompetitív gátlás során hosszan tartó inhibíció és V_{max} csökkenés figyelhető meg, a K_m nem változik, tehát a szubsztrát koncentráció növelésével sem nő

a reakció katalízis sebessége [Deodhar et al. 2020, Pelkonen et al. 1998]. CYP katalízis nem-kompetitív gátlására jó példa a piperin CYP3A4 enzimre gyakorolt hatása [Volak et al. 2008], valamint a fluvoxamin CYP2C19 enzimre gyakorolt gátlása. A kompetitív és a nem-kompetitív gátló tulajdonságok természetesen egyszerre is jellemezhetnek (kevert gátlás), erősebb gátló hatást kiváltva mint külön-külön (pl: a CYP3A enzimek ketokonazolal történő kevert gátlása) [Deodhar et al. 2020].

A reverzibilis típusú gátlásokon túl az idő függő, vagy mechanizmus alapú gátlások játszanak fontos szerepet a CYP enzimek működésében. A gátlószer vagy annak metabolitja kovalensen kötődhet az enzimhez hosszan tartó gátlást okozva. Az idő függő gátlások során a szubsztrát átalakulás sebességével párhuzamosan a gátolt enzimek aránya is növekszik, mely egy idő után plató fázisba ér (maximális gátoltság) [Lin & Lu 1998, Riley et al. 2007]. A szakirodalom „kvázi irreverzibilis gátlásként” említi a katalízis során keletkező, anyagcseretermék komplexek (MIC=metabolite intermediate complex) erős kötődését az enzim katalitikus helyének közelében, mely ugyan nem jelent végleges kovalens kapcsolatot, de fiziológias körülmények közt szinte teljesen inaktíválja az enzimet. A gátló köztitermék jelenségre klasszikus példaként említhető a makrolid antibiotikum eritromicin és klaritromicin kötődése a CYP3A4 enzim aktív helyéhez [Deodhar et al. 2020, Lin & Lu 1998]. A mechanizmus alapú gátlás másik formája a ténylegesen irreverzibilis gátlás, más néven „öngyilkos szubsztrát” okozta gátlás. Az irreverzibilis gátláshoz vezető reakcióban, a katalízis eredményeként egy reaktív köztitermék keletkezik, mely erős kovalens kötéseket képez az enzimmel. A kovalens kötések létrejötte miatt az enzim konformációs szerkezete megváltozik, így az enzim szerkezeti és funkcionális is sérül. Valódi irreverzibilis gátlásra példa az esomeprazol CYP2C19 enzim gátlása [Deodhar et al. 2020].

A reverzibilis és az irreverzibilis gátlások összehasonlításaként elmondható, hogy a reverzibilis gátlások esetén a gátlás addig tart, amíg a gátlószer jelen van, tehát a gátlószer visszavonása, eliminációja után az enzim „regenerálódik”. Irreverzibilis gátlás esetében viszont új, időigényesebb *de novo* fehérjeszintézisre van szükség az enzimaktivitás visszaállításához. A gyógyszeres terápiák során fellépő mechanizmus alapú gátlások (dozírozástól függően) igencsak nagy kihívást jelentenek mind a klinikusok mind pedig a betegek számára [Lin & Lu 1998].

2.4 A gyógyszer-metabolizmus és a CYP enzimek jelentősége a klinikai gyakorlatban

2.4.1 CYP enzim expresszió és aktivitás jelentősége végstádiumú vesebetegség esetén

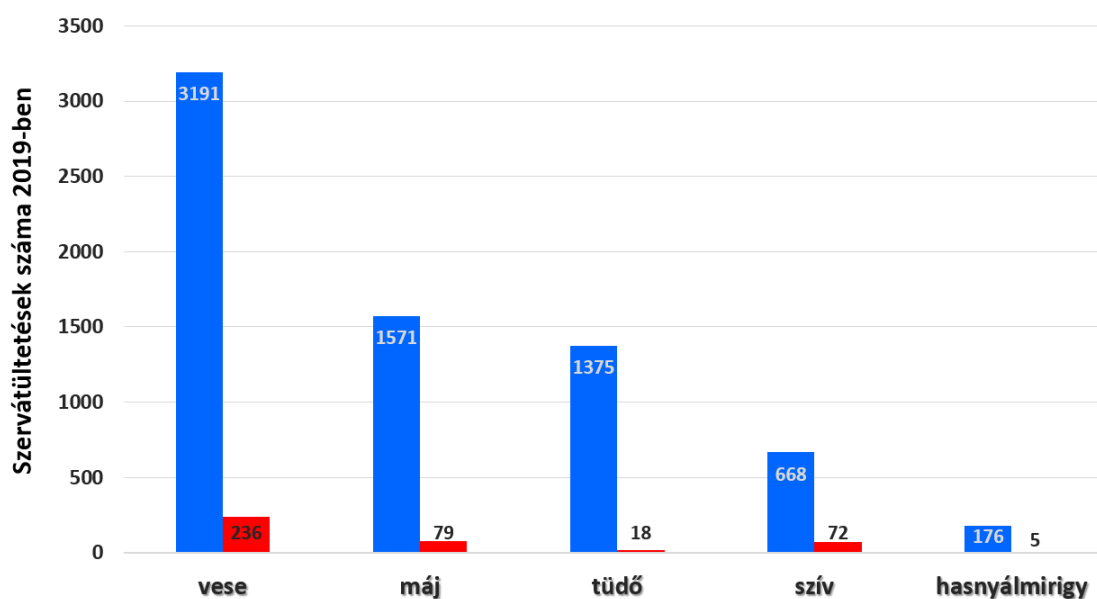
A föld népességének körülbelül egy tizede krónikus vesebetegséggel él együtt [Bikbov et al. 2020, Jha et al. 2013], ezt az arányt inkább felülről közelítik az európai adatok, ahol a regionális viszonyok függvényében 4,1% és 25,5% közt mozog a vesebetegséggel élők részaránya [Hill et al. 2016, Stel et al. 2017]. Az európai kontinensre vonatkozó 2018-as jelentés szerint a krónikus vesebetegek 0,1-0,2%-a végstádiumú veseelégtelenségben szenved [Kramer et al. 2021]. A végstádiumú vesebetegség egy irreverzibilis állapot, amivel a glomerulus filtrációs ráta drasztikus csökkenése és gyakran proteinuria is jár [Stevens & Levin 2013]. A krónikus vesebetegség jelenleg globálisan használt meghatározása a KDIGO ('Kidney Disease Improving Global Outcome') 2012-es irányelvein (Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease) alapul. Az irányelv alapján a krónikus vesebetegség definíciója: a vese struktúrájának vagy működésének rendellenessége, amely legalább 3 hónapja fennáll, egészségügyi következményeket okozva. A glomerulus filtrációs ráta (GFR) csökkenését kiváltó okok, a fennálló időtartam és az albuminuria mértékének figyelembevétele a megfelelő prognózis kialakításához különösen fontos. Legalább 3 hónapja fennálló 60 mL/percnél alacsonyabb 1,73 m² testfelületre viszonyított GFR esetén már az egyéb vesekárosodást jelző markerek jelenlététől/mértékétől függetlenül megállapítandó a krónikus vesekárosodás fennállása. A „KDIGO” útmutató a krónikus vesebetegség öt stádiumát állapítja meg a beteg GFR-kapacitása alapján. Az utolsó, legrosszabb veseparaméterekkel rendelkező fázist (G5) nevezik veseelégtelenségnek, ahol a GFR alacsonyabb, mint 15 ml/perc 1,73 m² testfelületre viszonyítva [Stevens & Levin 2013]. A veseelégtelenségben szenvedő betegeknél vese-pótló kezelésre van szükség, ami dialízist vagy a vese átültetését foglalja magába. Ez utóbbi természetesen csak abban az esetben, ha nem várható végzetes kimenetel a műtéti beavatkozás következtében. Habár hosszútávon a vesetranszplantáció a vese-pótló terápia optimális módja mind a veseelégtelenség kialakulása utáni túlélés, mind pedig az egészségügyi ellátórendszerre gyakorolt terhelés szempontjából, világszinten a betegek többsége mégis csak dialízisen (hemo vagy peritoneális) keresztül jut hozzá a vese-pótló kezeléshez, elsősorban a transzplantálható szervek hiánya, az egészségügyi infrastruktúra minősége vagy esetleg

kulturális szokások miatt [Romagnani et al. 2017, Vanholder et al. 2014]. A krónikus dialízis természetesen javítja a betegek várható élettartamát; azonban a dialízisek közti időben a toxinok csökkent ürülése, valamint az elektrolitok és vizeleti toxin szintek ingadozása további szövődményeket okozhat, például vérnyomás-ingadozást, miokardiális és agyi perfúzió csökkenést, valamint neurológiai szövődményeket [Karunaratne et al. 2018, Rizzo et al. 2012, Shafiee et al. 2017]. A társbetegségek miatt a krónikus vesebetegségben szenvedő páciensek kezelése az összes krónikus beteg populáció közt a legmagasabb gyógyszerterheléssel jár. A vesefunkció progresszív visszaesése csökkenti a renális gyógyszer clearance-et, ezért a gyógyszerek adagolása módosítást igényel. Azonban egyre inkább úgy tűnik, hogy nemcsak a renális kiürülés, hanem a vesén kívüli gyógyszer elimináció is csökken (pl. máj és bél metabolizmus) a vesefunkció károsodása esetén, ami klinikailag jelentős változásokat eredményez a gyógyszer-expozícióban [Ladda & Goralski 2016, Urquhart & Nolin 2020].

A krónikus veseelégtelenség során az extrarenális gyógyszer eliminációban megfigyelt változás pontos mechanizmusai még nem tisztázottak. A legvalószínűbb magyarázat szerint a krónikus elégtelenség módosíthatja a metabolikus és transzport folyamatokat, például a CYP enzimek aktivitását az enzimek közvetlen gátlásával és/vagy a veseelégtelenség során felhalmozódó urémiás toxinok, mediátorok transzkripciót csökkentő szabályozásával [Ladda & Goralski 2016, Lalande et al. 2014, Yeung et al. 2014]. Az urémiás toxinok közé sorolandó többek közt a paratiroid hormon, egyes citokinek, indoxil-szulfát, p-krezol, CMPF (3-karboxi-4-metil-5-propil-2-furánpropánsav) [Dreisbach 2009, Lalande et al. 2014, Watanabe et al. 2017]. Az FDA felmérése szerint a 2003 és 2007 között vizsgált gyógyszer engedélyeztetési folyamatok 30%-ban megváltozott farmakokinetikát detektáltak az extrarenális eliminációval ürülő gyógyszerek alkalmazása során krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeknél [Zhang et al. 2009]. Habár meggyőző *ex vivo* bizonyítékok szolgálnak az urémia által kiváltott gyógyszer eliminációbeli változásokra, klinikai vizsgálatokból egyelőre nincs még egyértelmű, közvetlen megerősítő eredmény. Ezért különös figyelmet kell fordítani a patkány hepatocitákból és az urémiás állatmodellekből nyert eredmények extrapolációjára a krónikus vesebetegségben szenvedő betegek klinikai ellátására vonatkozóan [Yeung et al. 2014].

2.4.2 Szervtranszplantáció

A szervátültetés a 20. századi kísérleti megközelítésből, mára a klinikai gyakorlatban világszerte elterjedt végleges kezelési lehetőséggé vált a végstádiumú szervi elégtelenségben szenvedő betegek számára [Black et al. 2018]. A „Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT)” szervezet „Organ Donation and Transplantation Activities 2019 Report.” jelentése alapján 2019-ben a világon 153863, hazánkban pedig 440 szervátültetést végeztek el [GODT 2021, OVSZ 2020]. Az elmúlt évtizedekben a gyorsan növekvő szervtranszplantációs aktivitásnak köszönhetően, egyre több szerv került fel a transzplantációs palettára, az utóbbi évtized öt leggyakoribb szerv átültetése: a vese, máj, szív, tüdő és a hasnyálmirigy transzplantáció volt mind az USA-ban mind pedig az Eurotransplant hálózathoz csatlakozott országokban [Eurotransplant 2019, Rana et al. 2015] (5. ábra).



5. Ábra. Az Eurotransplant országok (kék) és ezen belül Magyarország (piros) 2019-es transzplantációs aktivitása az elhunyt donorból származó szervátültetések vonatkozásában. Az Eurotransplant és az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) 2019-re vonatkozó éves jelentése alapján. [Eurotransplant 2019, OVSZ 2020]

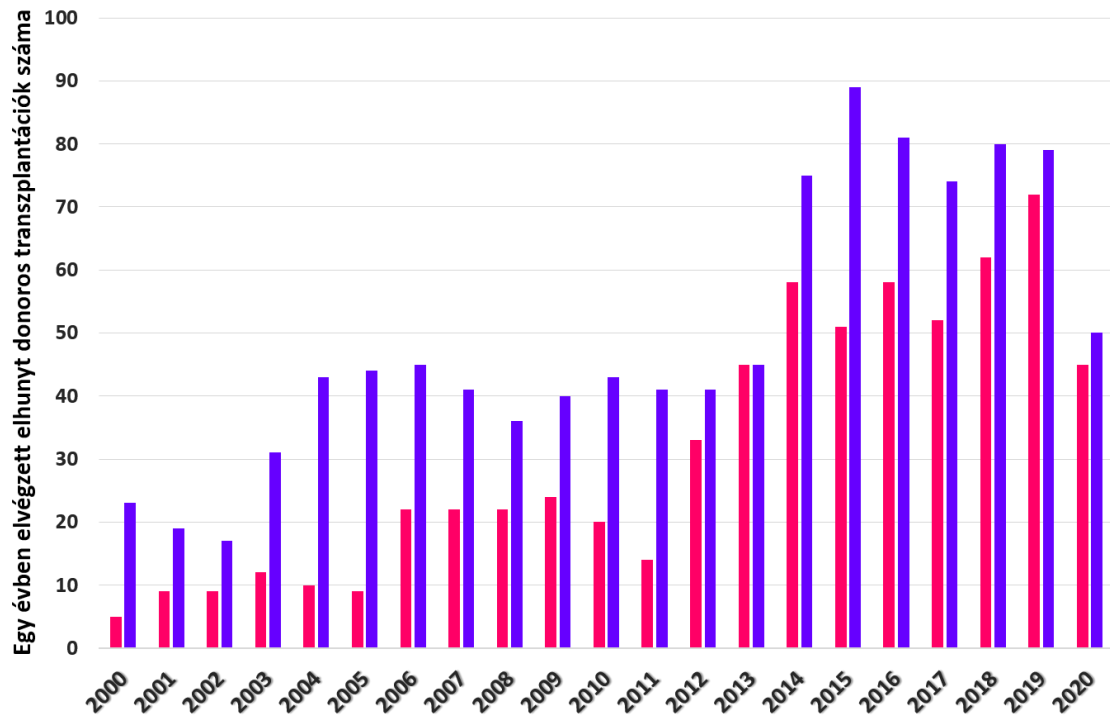
Az elvégzett szervátültetések száma azonban sajnos mindig alacsonyabb, mint az életmentő vagy életminőség javító transzplantációra szoruló betegek száma. A várólistákon szereplő betegek számára nincs elég megfelelő, beültethető szerv, még az elmúlt évek beültethetőségi kritériumokra vonatkozó bővítései ellenére sem.

Európában évente a várólistákon lévő betegek 15-30%-a nem jut időben beültethető szervhez [Lewis et al. 2021, Toniutto et al. 2017]. A magyar viszonyokat vizsgálva megállapítható, hogy országunk transzplantációs teljesítménye a 2010-es évek első felében markánsan megugrott az addigi aktivitáshoz képest. A látványos növekedés egyik (ha nem a) legjelentősebb tényezője az Eurotransplant nemzetközi nonprofit donor allokációs szervezethez történő csatlakozás volt [Hartyánszky et al. 2018, Langer 2018].

2.4.3 A szív-és máj transzplantáció rövid bemutatása

2019-ben a magyarországi transzplantációs aktivitás több mint egyharmadát a máj és szívátültetés adta [OVSZ 2020]. Mind a szív mind pedig a máj átültetése esetében életmentő beavatkozásról beszélhetünk, a szervek terminális funkcióvesztésének kialakulása miatt [Black et al. 2018]. Az „European Liver Transplant Registry„ adatbázisa alapján az európai felnőtt májtranszplantált recipiensek egy éves átlagos túlélése 83,8%, míg a 3 éves túlélési értékek majdnem elérik a 77%-ot (76,9%) (<http://www.eltr.org/Recipient-data.html>). A jelenlegi magyar adatok alapján a hazai 3 éves túlélés 85% fölött van [Bihari L. et al. 2021]. A fenti adatok értelmezéséhez mindenképp szükséges megemlíteni, hogy a nemzetközi májtranszplantációra vonatkozó adatok az elmúlt évtizedeket reprezentálják (1988-2020), míg a magyarországi statisztika csak a legfrissebb eredményeket mutatja be.

A Nemzetközi Szív-és Tüdőtranszplantációs Társaság adatai alapján egy négyéves vizsgálati periódusban (2013-2016) az európai felnőtt szívtranszplantáltak egy éves átlagos túlélése 80,5%, a 3 éves túlélés pedig 75,5% volt. A globális statisztikák valamelyest magasabb túlélési százalékokat mutatnak: 86,2% 1 éves és 80,3% 3 éves túlélést (<https://ishlt.org/research-data/registries/ttx-registry/ttx-quarterly-data-report>). Örömteli eredmény, hogy a legújabb magyarországi eredmények alapján a túlélési arány világviszonylatban is jónak számít, az egy éves túlélés ekvivalens (>90%) a legmagasabb nemzetközi arányokkal [Hartyánszky et al. 2018]. A teljes elhunyt donoros magyarországi szív- és májtranszplantációs aktivitás közelmúltbeli változásait a 6. ábrán illusztrálom.



6. Ábra A teljes elhunyt donoros magyarországi szív- és májtranszplantációs aktivitás 2000 és 2020 közt [OVSZ 2018a, OVSZ 2018b, OVSZ 2020].

2.4.4 Transzplantációt követő immunszuppressziós terápia

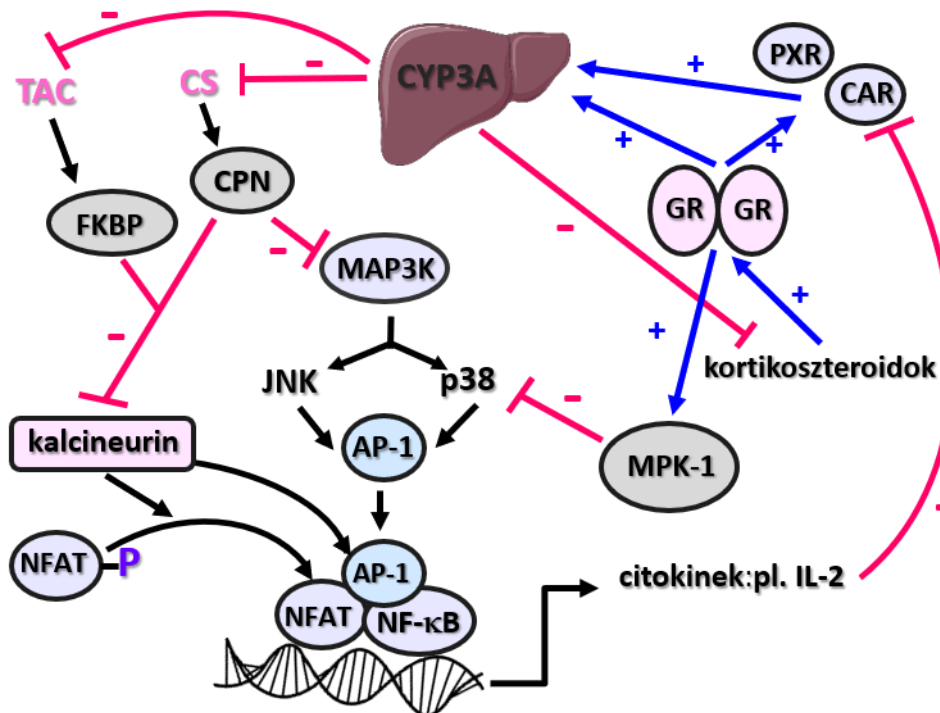
A különböző szervtranszplantációk növekvő sikeressége mellett, a posztoperatív túlélést negatívan befolyásoló tényezők, például a rejekció, a fertőzések és a gyógyszer toxicitás továbbra is kihívást jelentenek a klinikusok számára [Black et al. 2018, Martin-Gandul et al. 2015, Rossi & Vella 2016]. A hosszú távú poszttranszplantációs kilátások szempontjából a szervek előkészítésén és tárolásán, az operáció sebészeti technikáján és az intenzív osztályos kezelésen túl a rejekció (szerv-kilökődés) kivédését célzó immunszuppressziós terápia minősége különösen fontos tényezője a szervátültetés eredményességének [Holt 2017, Monostory 2018]. A recipiensek multidrogtérápiája a metabolikus gyógyszer-interakciók kialakulását tekintve komoly kockázati tényező, ezért az immunszuppressziós kezelés folyamatos monitorozása és optimalizálása elengedhetetlen feladat. 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 [Maldonado et al. 2021, Monostory 2018].

Az immunszuppresszió optimális beállítása nehéz feladat, ugyanis míg alacsony immunszuppresszáns vérkoncentráció mellett a recipiensnél a kilökődés veszélye áll fenn, addig a túlzott immunszuppresszió súlyos mellékhatásokat eredményezhet, melynek következtében fertőzések, daganatok és szervi diszfunkciók (pl.: vesekárosodás) is előfordulhatnak [Maldonado et al. 2021, Soderlund & Radegran 2015].

Az egyes immunszuppresszáns hatóanyagok terápiás alkalmazására természetesen megvannak a kidolgozott nemzetközi irányelvek, illetve a komplett immunszuppressziós terápia protokollja, azonban az egyes transzplantációs centrumoknál eltérő lehet a transzplantált recipiensek posztoperatív kezelése [Black et al. 2018, Charlton et al. 2018, Soderlund & Radegran 2015]. A különböző szolid szervtranszplantációkat (pl. a szív és a máj) követően a gyógyszeres immunszuppresszív terápia többé-kevésbé hasonló felépítésű. Alapvető célja, hogy a sejtés, valamint a humorális immunválasz modulációjával elkerülje a graft kilökődését, mely a recipiensre nézve fatális következményekkel járhat. Az esetek túlnyomó részében legalább egy immunszuppresszáns hatóanyagot a recipiensnek élete végéig szednie kell a graft normál működése érdekében [Black et al. 2018, Holt 2017].

A szervtranszplantációk egy részében, szervtől függően, vagy a magas akut rejekeiós kockázattal, esetleg gyenge vesefunkcióval rendelkező páciensek esetén a perioperatív vagy a korai posztoperatív időszakban egy intenzív profilaktikus ún. „indukciós” terápiát alkalmaznak, melynek jellemző komponensei a nagy dózisu kortikoszteroid gyógyszerek, valamint a poliklonális és monoklonális antitestek. Az indukciós terápiát nem alkalmazó terápia során pedig már közvetlenül a műtét után kezdődik az élethosszig tartó ún. „fenntartó” immunszuppresszív terápia [Holt 2017, Kim et al. 2018, Moini et al. 2015]. Jelenleg a legtöbb transzplantációs centrum hármasszörös kezelést ún. „triple drug regime”-et alkalmaz, amely kalcineurin inhibitor (takrolimuszt vagy ciklosporint), antiproliferatív mikofenolsav származékot (mikofenolsavat vagy mikofenolát mofetil) és kortikoszteroidot (leggyakrabban prednizont, prednizolont vagy metilprednizolont) tartalmaz. Természetesen speciális indikáció esetén helyzet függően más hatóanyagot/hatóanyag kombinációt is alkalmaznak (pl.: mTOR/„mammalian target of rapamycin” gátlók).

A kalcineurin inhibitorok és a kortikoszteroidok molekuláris kölcsönhatásait a 7. ábra illusztrálja szemantikusan.



7. *Ábra* Kalcineurin inhibitorok és kortikoszteroidok immunszuppressziós hatásmechanizmusa vázlatosan megjelenítve. AP-1: aktivátor protein 1, CAR: konstitutív androsztán receptor, CS: ciklosporin, FKBP: takrolimusz kötő protein, GR: glükokortikoid receptor, IL-2: interleukin-2, JNK: c-Jun N-terminális kináz, MAP3K: mitogén-aktivált protein 3 kináz, MPK-1: mitogén-aktivált protein kináz 1, NFAT: az aktivált T-sejtek nukleáris faktora, PXR: pregnán X receptor, TAC: takrolimusz. Monostory Katalin ábrája alapján [Monostory 2018]

A hatóanyagokat a beültetett szerv függvényében gondosan választják meg, a dozírozást pedig egyénileg, titrálva építik fel a kilökődés és a káros hatások elkerülése érdekében. A posztoperatív időszak korai szakaszában a fenntartó immunszuppresszív kezelés általában nagyobb dózisban, magasabb cél terápiás vérszinttel alkalmazzák, majd a műtétet követő egy év során hatóanyagok dózisát fokozatosan csökkentik (esetenként elhagyják) a mellékhatások minimalizálása érdekében [Baraldo et al. 2014, Holt 2017, Kobashigawa & Luu 2017, Moini et al. 2015]. A széles körben elterjedt és alkalmazott három-komponensű immunszuppresszáns terápiák ellenére gyakori problémát és vezető halálokot jelent a páciensek körében az akut allograft kilökődés. Ilyen esetekben gyakran egy bólus vagy ahogy a nemzetközi szakirodalomban nevezik „pulse” szteroid terápiát alkalmaznak, miszerint a páciensek sokszor parenterális úton szuprafarmakológiai dózisban kapnak kortikoszteroidot (pl. 3-5 napig 10 mg/ttkg metilprednizolon *i.v.*) [Kim et al. 2018, Massad 2004].

2.4.5 Kalcineurin inhibitorok

A ciklosporin és a takrolimusz immunszuppresszív hatását a kalcineurin foszfatáz enzim gátlásával éri el, ezért ezt a két hatóanyagot kalcineurin inhibitoroknak nevezi a szakirodalom [Sommerer et al. 2012]. 1978 után a ciklosporin bevezetésének köszönhetően a szervtranszplantációt követő immunszuppresszív terápiában forradalmi változások következtek be. A ciklosporin alkalmazása a fenntartó terápiákban csökkentette az akut és krónikus graft rejekciók előfordulását így növelve a páciensek túlélési esélyeit [Dandel et al. 2010]. A ciklosporint a *Tolypocladium inflatum Gams* nevű gombatorzs állítja elő, szerkezetét tekintve egy ciklikus endekapeptid. Lipofil tulajdonságai miatt gyakran ricinusolajhoz kötik, hogy intravénásan is adagolható legyen. A ciklosporin szelektíven és reverzibilisen gátolja a T-sejt függő immunválaszt, ugyanakkor egyéb sejtek proliferációját nem befolyásolja. Bár kevésbé hatékony immunszuppresszáns, mint a takrolimusz, a ciklosporint manapság is alkalmazzák, főként olyan betegeknél, akik a takrolimusszal szemben intoleránsak. Számos kedvezőtlen mellékhatása (vese- és májtoxicitás, vérnyomás emelkedés) mellett, a takrolimusszal ellentétben fokozott szőrnövekedést és fogínyvérzést is okoz [Soderlund & Radegran 2015].

A takrolimusz napjainkban igen széles körben alkalmazott, és a modern immunszuppresszió sarokkövének, alapvető gyógyszerének számít [Brunet et al. 2019, Maldonado et al. 2021]. A takrolimusz (korábbi munkanevén FK-506-ot), mely egy makrolid lakton szerkezetű molekula, a *Streptomyces tsukubaensis* nevű baktérium törzsből izolálva fedezték fel 1984-ben. A klinikai gyakorlatban hasonlóan a ciklosporinhoz, kalcineurin inhibitor tulajdonságai miatt alkalmazzák. A takrolimusz nagyságrendekkel hatékonyabb immunszuppresszáns, mint a ciklosporin, ezért manapság a takrolimusz használata elterjedtebb. A kalcineurin inhibitorokat elsődlegesen a szervátültetések (tüdő, vese, máj, szív stb.) után, a rejekció elleni védekezésben használják, de egyéb indikációk esetén pl. gyulladásos bélbetegségek és autoimmun rendellenességek esetében is alkalmazzák [Baumgart & Sandborn 2007, Harrison et al. 2007].

Mindkét hatóanyag mellékhatás profiljában szembetűnő a vesetoxicitás fokozott kockázata, ugyanakkor a takrolimusz használatakor a diabétesznek és a neurotoxikus reakcióknak nagyobb az előfordulási valószínűsége.

Takrolimusz kezelés esetén viszont ritkább a magas vérnyomás, a hiperlipidémia, és a malignus daganatok előfordulása, valamint alacsonyabb a bél- és hormonális problémák megjelenésének valószínűsége [Denton et al. 1999, Farouk & Rein 2020]. A diabétesz, hiperlipidémia és a magas vérnyomás mind komoly valószínűsítő tényezője lehet a szív allograft vaszkulopátia krónikus kórkép megjelenésének, mely átlagosan minden második szívatültetésen átesett betegnél előfordul a transzplantációt követő 10 évben [Ramzy et al. 2005].

A takrolimusz szűk terápiás tartománya és az egyének közötti nagy farmakokinetikai variabilitás miatt elengedhetetlen a takrolimusz vérkoncentrációjának folyamatos ellenőrzése az optimális terápiás hatékonyság érdekében [Brunet et al. 2019, Han et al. 2019, Monostory et al. 2015]. A kiegyensúlyozatlan, szuboptimális terápia allograft kilökődéshez vezet, míg a supraoptimális terápia nephrotoxicitást, neurotoxicitást vagy a fertőzések iránti fokozott fogékonyságot eredményezhet. Ezért minden olyan tényező, amely módosíthatja az immunszuppresszánsok, különösen a takrolimusz vérkoncentrációját, jelentősen befolyásolja a transzplantáció kimenetelét [Albring et al. 2015, Monostory 2018, Soderlund & Radegran 2015]. A takrolimusz szubsztrátja a P-gp transzporternek (*ABCB1* gén által kódolt fehérje) és a CYP3A enzimeknek [Dai et al. 2006, Saeki et al. 1993], ezért a takrolimusz farmakokinetika jelentős interindividuális variabilitása feltételezhetően összefügg a P-gp efflux transzporter és a gyógyszer-metabolizáló CYP3A enzimek genetikai változatosságával [Hesselink et al. 2003, Provenzani et al. 2013]. Számos klinikai vizsgálatban tanulmányozták az *ABCB1* polimorfizmusok hatását szervátültetést követően a takrolimusz expozíciójára; azonban nincs meggyőző bizonyíték az *ABCB1* variánsok és a takrolimusz biohasznosulása közti összefüggésre [Brunet et al. 2019, Tron et al. 2019, Zhang et al. 2018]. Valószínűsíthető, hogy az *ABCB1* polimorfizmusai helyett elsősorban a máj, valamint esetlegesen a bél takrolimusz-metabolizáló képessége befolyásolja a takrolimusz biohasznosulását.

2.4.6 CYP3A enzimek szerepe az immunszuppresszánsok metabolizmusában

A CYP3A enzimek (CYP3A5, CYP3A4) domináns szerepet játszanak a takrolimusz metabolizmusában, ebből kifolyólag a CYP3A enzimek genetikai polimorfizmusai jelentősen hozzájárulhatnak a betegeknél tapasztalható takrolimusz „clearance” variabilitásához [Brunet et al. 2019, Hesselink et al. 2003, Saiz-Rodriguez et al. 2020, Zhang et al. 2018]. A kaukázusi populációban a leggyakrabban előforduló allél a *CYP3A5*3* (6986A>G, rs776746), ahol egyetlen nukleotid tranzíciója RNS splicing defektust hoz létre, a polimorfizmus csonkolt mRNS-t és a funkcionális CYP3A5 enzim hiányát eredményezi [Kurose et al. 2012, Lamba et al. 2002]. A „Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium” a *CYP3A5* genotípus alapján beállított takrolimusz dozírozást javasolja az optimális vérkoncentráció gyors és biztonságos elérése érdekében [Birdwell et al. 2015]. A szakirodalomban további *CYP3A* allélvariánsokra vonatkozó javaslatokat is találunk a takrolimusz-metabolizáló képesség előrejelzésével összefüggésben, például a *CYP3A4*1B* és a *CYP3A4*22* allélokra vonatkozóan [Brunet et al. 2019, Elens et al. 2013, Werk & Cascorbi 2014]. A *CYP3A4*1B* (392A>G, rs2740574) az irodalmi adatok szerint hozzájárul a *CYP3A4* gén fokozott transzkripciójához, jóllehet a vad típusú *CYP3A5*1* és a *CYP3A4*1B* allélok közötti szoros genetikai kapcsoltság egy jól alátámasztott jelenség, mely megnehezíti a *CYP3A4*1B* takrolimusz metabolizmusban játszott szerepének egyértelműsítését [Birdwell et al. 2012, Shi et al. 2015]. Irodalmi adatok alapján a *CYP3A4*22* (15389C>T, rs35599367) allél alacsony CYP3A4 expresszióval és csökkent aktivitással jár [Okubo et al. 2013], a lényeges interindividuális vagy akár az egyénen belüli metabolikus variabilitás azonban aligha tulajdonítható pusztán a CYP3A enzimek genetikai polimorfizmusainak. A *CYP3A* genotípus egyfajta intrinzik genetikai kapacitást határoz meg a CYP3A enzimek expressziójára vonatkozóan, míg a nem-genetikai tényezők, például a párhuzamosan alkalmazott CYP3A-induktor (pl. glükokortikoidok, rifampicin) kezelés, vagy a gyulladásos folyamatok mind elősegíthetik a fenokonverzió megvalósulását, amely során változhat a CYP3A expresszió és ezáltal a takrolimusz „clearance” is [Hukkanen 2012, Shah 2017, Shah & Smith 2015]. Korábbi tapasztalatok szerint a betegek kalcineurin inhibitor metabolizáló képességét a CYP3A-státusz meghatározásával (*CYP3A5* genotípus és *CYP3A4* expresszió) jellemezhetjük [Monostory et al. 2015]. A *CYP3A5* genotípus meghatározásával beazonosíthatjuk a

CYP3A5 expresszálókat vagy nem expresszálókat, és a leukocitákból mért CYP3A4 expresszió alapján képesek vagyunk megbecsülni a máj CYP3A4 aktivitásának csökkenését vagy fokozódását [Temesvári et al. 2012]. Kutatócsoportunk májtranszplantált betegeknél sikeresen alkalmazta ezt a komplex diagnosztikai rendszert (CYPtest™), ami egyértelműen alátámasztotta, hogy a CYP3A-státusz által irányított takrolimusz terápia jelentősen csökkentette a hibás dozírozás okozta akut kilökődés és nephrotoxicitás kockázatát [Csikány et al. 2021].

Az immunszuppresszáns gyógyszerek (mTOR gátlók, kortikoszteroidok és kalcineurin inhibitorok) metabolizmusában kulcsszerepet játszanak a CYP3A enzimek [Groll et al. 2017, Sparkes et al. 2019]. A CYP3A enzimek és kortikoszteroidok relációja nem merül ki egy egyszerű enzim-szubsztrát viszonyban. A kortikoszteroidok nemcsak hogy szubsztrát sajátágaik miatt kompetitív inhibitorokként gátolják a CYP3A enzimeket [Zhang & Yang 2009], hanem induktor tulajdonságaik következtében a *CYP3A* gén transzkripcióját is fokozzák. Az aktivált glükokortikoid receptor egyrészt fokozza a *CYP3A* gén transzkripció szabályozásában részt vevő nukleáris receptorok expresszióját (PXR és CAR). Másrészt a *CYP3A4* gén proximális promoter régiójában található glükokortikoid érzékeny régió közvetlenül képes kötni az aktivált glükokortikoid receptort, mely fokozza a *CYP3A* gén transzkripcióját. A CYP3A enzimek széles gyógyszer-metabolizáló skálája, a máj és bél fal nagy enzimtartalma és az expressziójuk-aktivitásuk összetett szabályozása következtében metabolikus gyógyszer-kölcsönhatásokra lehet számítani, ha az egyidejűleg alkalmazott gyógyszerek metabolizmusához CYP3A aktivitás szükséges [Gibson et al. 2002, Monostory & Dvorak 2011]. A CYP3A enzimek genetikai polimorfizmusa, valamint a fenokonverzió jelensége lényegesen befolyásolhatja az immunszuppresszáns hatóanyagok vérszintjét, éppen ezért a transzplantált betegek CYP3A-státuszának folyamatos monitorozása hozzájárulhat a terápia optimalizálásához [Klomp et al. 2020, Monostory 2018].

3 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 mutatózó interindividuális különbségek számos esetben a nagyfokú genetikai polimorfizmusra vezethetők vissza, azonban a CYP enzimek genetikai polimorfizmusa csak részben ad magyarázatot a gyógyszer-metabolizmusban mutatózó 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 mRNA expressziójára szívtranszplantált betegeknél;
- felmérjük szívtranszplantált betegeknél a korai posztoperatív időszakban a CYP3A-státusz (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 mRNA expresszió) összefüggését a takrolimusz expozíciójával; feltárjuk, hogy van-e összefüggés a betegek CYP3A-státusza és a dózis/testtömeggel normalizált vérszintek, valamint a terápiás vérszint eléréséhez 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 mRNA 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.

4 Módszerek

4.1 CYP mRNS expresszió mérési módszer optimalizációja

4.1.1 Vérminták

A szervdonoroktól (N=110) és a végstádiumú vesebetegségben szenvedő betegektől (N=105) származó vérminták a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikájáról érkeztek laboratóriumunkba. A Természettudományi Kutatóközpont Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoportja rendelkezik az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével humán szervdonor és vese recipiens vérminták tudományos célból történő felhasználásához (4799-0/2011-EKU). A vizsgálatot 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. Az egészséges vesefunkcióval rendelkezőnek tekintett szervdonorok és a veseelégtelenségben szenvedő betegek együttesen az európai fehér populációhoz tartoztak, demográfiai adataik a Függelékben találhatóak (8. táblázat). A vérminták levétele a donorok esetén a szervkivétel idején, a vesebetegeknél pedig a reggeli gyógyszerelés előtt történt.

4.1.2 Leukocita izolálás

A vérminták hűtve, EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátlót tartalmazó vérvételi csövekben érkeztek a Természettudományi Kutatóközpontba. A vérminták feldolgozása során 500 µl alvadásgátló vérhez 1 ml vörösvértest lízis puffert (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH=7,4) adtunk, majd 10 perces, lassú kevertetést követően centrifugáltuk (5 perc, 1000×g). A centrifugálást követően kiülepedett fehérvérsejteket további 1 ml lízis pufferben szuszpendáltuk, majd a centrifugáló lépést megismételtük (5 perc, 1000×g). A felülúszó eltávolítása után a vörösvértestektől megtisztított fehérvérsejtek kb. egytizedét PBS (foszfát tartalmú sóoldat) pufferben szuszpendáltuk, a fennmaradó részt pedig RNS izoláló reagensbe tettük, és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.1.3 RNS izolálás

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. Mind a hat reagens fenol és guanidin-izotiocianát elegyét tartalmazza: (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 TRIzol™, a TRI Reagent®, a Trizolate Reagent® és a RiboZol® RNS extrakciós reagens kloroform-indukált fázis-szétválasztást alkalmaz; míg az RNAzol® RT és a NucleoZOL reagens RNáz mentes vizet igényelnek a DNS és a fehérje szennyeződések precipitációjához. A további körülmények és lépések, mint az RNS kicsapódást elősegítő 2-propanol hozzáadása, centrifugálás, a RNS precipitátum mosása 75%-os etanollal, valamint az RNS visszaoldása RNáz-mentes vízben minden egyes izolációs folyamatban azonos volt. 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 mintákat további felhasználásig -80°C-on tároltuk.

4.1.4 Reverz Transzkripció

Az izolált totál RNS reverz transzkripciója során öt, kereskedelmi forgalomban kapható cDNS (RNS szekvenciára komplementer DNS szekvencia) szintézis készletet hasonlítottunk össze a reverz transzkripció hatékonysága és a dinamikus tartomány szempontjából: (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). Mind az öt cDNS szintézis termék oligo (dT) és véletlenszerű hexamer primerek kombinációját tartalmazta. A mérések közötti eltérő templát tartalmú minták használatának elkerülése érdekében a cDNS szintézis termékek teszteléséhez ugyanazt az RNS mintát használtuk, amelyet előzetesen a három önkéntes kevert leukocita populációjából a TRI Reagent® reagens segítségével izoláltunk. A reverz transzkripció reakciókat minden esetben a gyártó utasításait követve végeztük el. A kiindulási teljes RNS minta hígításával az 51,2 pg – 4 µg templát RNS koncentráció tartományt vizsgáltuk, ötszörös hígítási faktort alkalmazva. A reverz transzkripció hatékonyságát cDNS templátot használó polimeráz láncreakcióval (PCR) határoztuk meg. A CYP3A4 expresszió mérését valós idejű PCR technikával, ún. qPCR (quantitative polymerase chain reaction) technikával végeztük. A qPCR mérések C_q értékeire (kvantifikációs ciklusszám/áttörési pont) illesztett standard görbét a hígított minták RNS tartalmának tízes alapú logaritmusához viszonyítva ábrázoltuk. Minden cDNS szintézis termékre külön-külön számítottuk ki a készítmény-specifikus korrelációs együtthatókat (R^2), a standard görbék meredekségét, valamint a reakció hatékonyságát.

4.1.5 Relatív mRNA expresszió mérés kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval (qPCR)

A cDNS amplifikációhoz a KAPA Probe Fast qPCR kits (Universal) terméket használtuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A CYP mRNA-ek mennyiségét a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) referencia gén mRNA expressziójához viszonyítva határoztuk meg úgy, hogy a vizsgálandó mintákban a GAPDH transzkripcióját stabilnak tekintve 1-nek vettük, és a CYP mRNA szintjét a GAPDH expresszióhoz viszonyítottuk. A duplex méréshez optimalizáltuk a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 primereket és próbákat, melyeket a 6. táblázatban jelenítettem meg. 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).

4.2 Végstádiumú vesebetegek és egészséges vesefunkcióval rendelkező szervdonorok CYP mRNS expressziójának értékelése

A CYP expressziót 110 szervdonor és 105 végstádiumú vesebeteg leukocitáiban határoztuk meg. A minták származási leírását és a felhasználásukhoz szükséges engedélyek adatait a Módszerek szekció 4.1.1. Vérminták alfejezete ismerteti. A statisztikai elemzést 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 CYP expressziós adatok eloszlását Kolmogorov–Smirnov teszttel elemeztük, a csoportok közötti különbségeket pedig Mann–Whitney U teszt segítségével vizsgáltuk. 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 [Temesvári et al. 2012]. A leukocitákban megállapított relatív CYP mRNS expressziós határértékek: (CYP1A2 (10^{-5} és 5×10^{-4}), CYP2C9 (2×10^{-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 végstádiumú vesebetegeknél az alacsony, átlagos és magas expressziós értékek előfordulását χ^2 teszt segítségével hasonlítottam össze a szervdonorok expressziós értékeivel. A $P < 0,05$ valószínűséggel jellemzett különbségeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4.3 A CYP3A-státusz összefüggése a takrolimusz vérkoncentrációval és dóziséigénnyel szívatültetett betegeknél

4.3.1 Szívatültetett betegek

A vizsgálatba felnőtt, szívatültetett betegeket vontunk be (N=232) a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikájáról. A recipiensek CYP3A-státuszának tesztelését és a vizsgálati protokollt az Egészségügyi Tudományos Tanács,

Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (2112-2/2017/EKU, 32911-2/2019/EKU). A vizsgálatot 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. Közvetlenül a transzplantáció után 232 recipiensnél határoztuk meg a CYP3A-státuszt (CYP3A4 mRNA expresszió és CYP3A5 genotípus), valamint 163 beteget vontunk be a CYP3A-státusz és a posztoperatív takrolimusz vérkoncentráció és dóziséigény kapcsolatának értékelésébe. A 232 vizsgált beteg közül 14 beteg halt meg a műtétet követő első két hétben, míg 55 beteg vagy erős CYP3A-gátló kezelésben részesült (pl. flukonazol, itrakonazol), vagy röviddel a transzplantáció után áthelyezték egy másik egészségügyi intézménybe; ezért ezeket a betegeket (N=69) kizártuk a további elemzésből. A vizsgálat longitudinális utánkövetés részében a transzplantációt követő első 15 hónapban 78 betegnél követtük és rögzítettük a CYP3A4 mRNA expressziót, valamint a takrolimusz kezelés paramétereit (dózis, vérszint, testsúly). A betegek demográfiai és klinikai adatait a függelék 9. táblázata mutatja be. A transzplantáció utáni gyógyszeres terápiát a konvencionális klinikai protokoll szerint építették fel, amely tartalmazott immunszuppresszánsokat, valamint profilaktikus gyógyszereket, például antibiotikumokat (szulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacín, meropenem) és vírusellenes gyógyszereket (ganciklovir, valganciklovir), vérnyomáscsökkentő szereket (lerkanidipin, ramipril, perindopril), koleszterincsökkentőt (rozuvasztatin), savcsökkentő gyógyszereket (famotidin, pantoprazol) és szükség esetén fájdalomcsillapítókat (paracetamol, ibuprofen). A műtét utáni későbbi időszakban a legtöbb gyógyszert elhagyták, a takrolimuszt azonban egész életen át tartó kezelésként alkalmazzák.

4.3.2 Immunszuppresszáns terápia és takrolimusz vérszint monitorozás szívtranszplantált betegeknél

A szívtranszplantációt követően azonnal megkezdődött az indukciós immunszuppresszív terápia anti-timocita-globulinnal, nagy dóziséjú kortikoszteroiddal (metilprednizolon) és mikofenolát-mofetilal, az indukciós gyógyszerelés a műtétet követő 4. napig tartott. Ezt követően a fenntartó terápia a takrolimusz, kortikoszteroid és a mikofenolát-mofetil hatóanyagok kombinációjára támaszkodott. A kezdeti, műtét idején beadott 250 mg-os

kortikoszteroid dózist követően a dózisok fokozatosan (125-16-12 mg/nap) csökkentek míg a transzplantáció utáni 3. hét végére beállt a napi 8 mg metilprednizolon adagolás. A kortikoszteroid dózis az első év végére napi 2 mg-ra csökkent, a 15. hónapra pedig teljesen elhagyták. A mikofenolát-mofetil a korai posztoperatív időszakban 3 g-os napi dózisban alkalmazták, a takrolimusz terápiás vérszintjének elérésekor (>10 ng/ml) pedig napi 2 g-ra csökkentették. A takrolimusz terápiát a szívatültetés után 5 nappal kezdték el, naponta kétszeri gyógyszerbevételel alkalmazva (Prograf, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japán). A reggeli és az esti dózis összege adta ki a napi dózist. A reggeli dózis a takrolimusz mélykoncentráció (C_0) méréshez szükséges vérvétel után, az esti dózisra pedig a reggeli gyógyszerbevételel képest 12 órával később került sor. A kezdeti takrolimusz dózist 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. Az orális takrolimusz dózist a terápiás céltartományhoz igazították, mely az első 6 hónapban 10-15 ng/ml, 6-12 hónapig 8-12 ng/ml, egy évvel a transzplantáció után pedig 5-10 ng/ml közti koncentráció volt. A takrolimusz terápiás gyógyszer vérszint monitorozását rutinszerűen végezték (a takrolimusz kezelés megkezdése utáni első héten minden nap, a második héttől minden másnap, egy hónap elteltével pedig havonta legalább egy alkalommal), a dózist szükség szerint módosították, ha a vérkoncentráció kívül esett a terápiás céltartományon. A takrolimusz (C_0) mélykoncentrációját az esti gyógyszerbevételel után 12 órával, reggel 6 óra körül a reggeli dózis bevétele előtti vérvétel alapján teljes vérből határozták meg. A takrolimusz vérkoncentrációt enzim immunoesszé technikával a Dimension[®] rendszeren a Tacrolimus Flex Reagent Cartridge reagenssel mérték (Dade Behring Inc., Newark, DE). A takrolimusz vizsgálati koncentráció tartománya 1,1–33,6 ng/ml volt. A napon belüli és a napok közti kvantifikációs variabilitás kevesebb mint 10% volt.

4.3.3 A szívatültetett betegek CYP3A-státuszának meghatározása

A 232 szívatültetett recipiens CYP3A-státuszának megállapítása perifériás vérmintából történt. A CYP3A genotipizáláshoz és a CYP3A4 expresszió méréséhez szükséges vérmintát az operációt követő 2. napon vették le. Azoknál recipienseknél, akik részt vettek az utánkövetéses vizsgálatban, a CYP3A4 mRNS expressziót a transzplantáció után 1, 3, 6, 12 és 15 hónappal is mértük. A perifériás vérmintákból a leukocitákat a 4.1.2.

alfejezetben leírtak alapján izoláltuk. A genomiális DNS extrakciót, a fehérvérsejt izolálás során kapott, 100 µl foszfát pufferben szuszpendált sejtekből (foszfát puffer: 2,68 mM KCl, 136,7 mM NaCl 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄ pH 7,4) Quick-DNA™ Universal Kit (ZYMO Research, Irvine, CA) DNS izoláló termékkel végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján. A kinyert DNS tisztaságát és koncentrációját a NanoDrop 1000™ spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific Inc.) határoztuk meg, a DNS mintát pedig további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

A *CYP3A5* és *CYP3A4* allélokot (*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 *CYP3A* genotipizáláshoz szükséges primer és próba oligonukleotid szekvenciákat, az alkalmazott végkoncentrációkat a 3. táblázat tartalmazza. A genotípusokat poszt PCR allél-diszkriminációval különböztettük meg, a vad és mutáns allélok relatív fluoreszcencia értékei alapján [Monostory et al. 2015].

3. Táblázat A *CYP3A* genotipizáláshoz használt primer és a próba oligonukleotid szekvenciák Déri és munkatársai táblázata alapján [Déri et al. 2021].

oligonukleotid	oligonukleotid szekvencia 5'→3'	végkoncentráció
<i>CYP3A5*3</i> „forward” primer	GAG AGT GGC ATA GGA GAT ACC	300 nM
<i>CYP3A5*3</i> „reverse” primer	TGT ACG ACA CAC AGC AAC C	300 nM
<i>CYP3A5*3</i> vad próba	FAM- TTT GTC TTT CA <u>A</u> TAT CTC TTC CCT GT -BHQ1	100 nM
<i>CYP3A5*3</i> mutáns próba	CalRed610- TTT GTC TTT CA <u>G</u> TAT CTC TTC CCT GT -BHQ2	200 nM

3. Táblázat (folytatás)		
oligonukleotid	oligonukleotid szekvencia 5'→3'	végkoncentráció
<i>CYP3A4*1B</i> „forward” primer	TCT GTA GGT GTG GCT TGT TG	300 nM
<i>CYP3A4*1B</i> „reverse” primer	AAG GGT TCT GGG TTC TTA TCA G	300 nM
<i>CYP3A4*1B</i> vad próba	HEX- TCG CCT CTC T <u>C</u> TGC CCT TGT –BHQ1	200 nM
<i>CYP3A4*1B</i> mutáns próba	FAM- TCG CCT CTC T <u>C</u> TGC CCT TG – BHQ1	100 nM
<i>CYP3A4*22</i> „forward” primer	CAG AGG TAG GTC TAA TTC AGT TCA	400 nM
<i>CYP3A4*22</i> „reverse” primer	AGA TCA CCT TCT ATC ACA CTC C	400 nM
<i>CYP3A4*22</i> vad próba	FAM- ATC ACA CCC AG <u>C</u> GTA GGG C - BHQ1	100 nM
<i>CYP3A4*22</i> mutáns próba	HEX- ATC ACA CCC AG <u>T</u> GTA GGG CC –BHQ1	50 nM

BHQ1: "Black Hole Quencher 1", BHQ2: „Black Hole Quencher 2”

A CYP3A4 mRNS expresszió méréséhez a teljes RNS-t kivontuk a leukocitákból folyadék-folyadék extrakciós elven működő fenol és guanidin izotiocianát tartalmú TRI Reagent® használatával, a gyártó protokollját követve (Molecular Research Center Inc.). Az így kapott mintából pedig az RNS reverz transzkripcióját (5 µg) Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR termékkel végeztük el a gyártó útmutatásait követve (Thermo Fisher Scientific). A CYP3A4 mRNS expresszió vizsgálatát a genotípus meghatározáshoz hasonlóan valós idejű kvantitatív PCR segítségével végeztük, a 4.1.5. alfejezetben leírtak szerint.

4.3.4 A szívatültetett betegek CYP3A-státuszának és a takrolimusz kezelés összefüggéseinek értékelése

A *CYP3A5* és *CYP3A4* allélokban található SNP-k (rs776746 és rs2740574) közti kapcsoltsági egyensúlytalanságot (linkage disequilibrium) a Haploview szoftver segítségével számítottuk ki (v4.2; Broad Institute, Cambridge, MA, USA) [Barrett et al. 2005]. A recipienseket a megállapított CYP3A-státuszuk szerint kategorizáltuk. Azokat a betegeket, akik legalább egy *CYP3A5**1 allélt hordoztak, *CYP3A5* expresszálónak tekintettük, míg a *CYP3A5**3/*3 genotípussal rendelkező recipienseket a *CYP3A5* enzimet nem expresszáló kategóriába soroltuk. A funkcionális *CYP3A5* enzimmel nem rendelkező recipienseket a *CYP3A4* mRNS-szintjük alapján alacsony, átlagos és magas *CYP3A4*-expresszáló csoportokra osztottuk. A transzplantált betegek takrolimusz vérkoncentrációs értékeit a napi dózissal és testtömeggel normalizálva, (ng/ml)/(mg dózis/testtömeg kg) formában fejeztük ki. A normalizált vérkoncentráció (C_0/D) és az optimális terápiás szint eléréséhez szükséges dózisingények adatait a különböző CYP3A-státuszú recipiens kategóriákban a medián és az átlag \pm szórás (SD) értékek megjelenítésével fejeztük ki. Meg kell jegyezni, hogy a medián értékek általában nem különböztek az átlagértéktől (többnyire 7–10% eltérés). A statisztikai elemzést a GraphPad InStat (version 3.10; GraphPad Software) szoftver alkalmazásával végeztük. A posztoperatív CYP3A státusz és takrolimusz farmakokinetikai paraméterek összefüggéseit, valamint a *CYP3A4* mRNS expresszió és a takrolimusz vérkoncentráció időbeli alakulását Kruskal-Wallis variancia-analízissel, majd Dunn-féle többszörös összehasonlító teszttel értékeltük. A $P < 0,05$ valószínűséggel jellemzett különbségeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

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

4.4.1 Májtranszplantált betegek

Felnőtt májtranszplantált betegek bevonásával készült prospektív vizsgálatban felmértük a máj-donorok és a recipiensek *CYP3A5* genotípusának hatását a takrolimusz vérszint kialakulására. A *CYP3A5* donor/recipiens genotípus vizsgálatba bevont betegek (N=69) a Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján estek át

májtranszplantáción. A vizsgálati csoportban csak teljes szervi és első májátültetésükön átesett betegek szerepelnek.

A betegek CYP3A tesztelését és a vizsgálati protokollt az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta (4799-0/2011-EKU). A vizsgálatot 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 betegek demográfiai és klinikai adatain kívül (függelék 10. táblázat) rögzítettük a takrolimusz kezelés paraméterei is (dozírozás és C_0 vérkoncentrációk). Mind a donorok, mind pedig a recipiensek a kaukázusi (fehér) populációhoz tartoztak. A transzplantáció utáni gyógyszeres kezelés magába foglalta az immunszuppresszánsokat, gyulladáscsökkentőket, valamint profilaktikus gyógyszereket; például antibiotikumokat (szulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacín, meropenem), vírusellenes (ganciklovir, valganciklovir) és gombaellenes szereket (amfotericin B, flukonazol), savcsökkentő gyógyszereket (famotidin, pantoprazol), valamint szükség esetén fájdalomcsillapítókat/érzéstelenítőt (pl.: propofol).

4.4.2 A donor máj graftok és a recipiensek CYP3A-státuszának megállapítása

A donor máj graftok és a recipiensek CYP státuszának megállapítása azonos módon történt, mint a 4.3.3. alfejezetben leírt szívtranszplantált betegek CYP3A-státuszának meghatározása. A 4.3.3. alfejezet a leukocita izolálással kapcsolatban a 4.1.2. alfejezetre, az mRNS expresszió mérésre vonatkozóan pedig a 4.1.5. alfejezetre hivatkozik.

4.4.3 Immunszuppresszáns terápia és takrolimusz vérszint meghatározás májtranszplantált betegeknél.

A májátültetett betegek takrolimusz kezelését 6 órával a transzplantáció után 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 dózisa pedig a reggeli gyógyszerbevitelhez képest 12 órával később került sor. A takrolimusz kezdő dózisát 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. Az orális takrolimusz dózist a terápiás céltartományhoz igazították, ami a korai posztoperatív időszakban 10 és 15 ng/ml

közti vérkoncentrációt jelent. A napi takrolimusz dózis kiszámításához a $(\text{cél } C_0/\text{aktuális } C_0) \times \text{aktuális dózis}$ algoritmust alkalmazták.

A takrolimuszon alapuló immunszuppresszív terápiát mikofenolát-mofetil és szteroid (metilprednizolon) hármaskombinációjával építették fel. A mikofenolát-mofetilt 2 g/nap dózisban alkalmazták a korai posztoperatív időszakban, míg a műtét idején beadott kezdeti 1 grammos metilprednizolon dózist a műtét utáni első hét során fokozatosan csökkentették (500–250–125–32 mg/nap), az első hét végére érte el a 32 mg/nap dózist, ezt követően pedig napi 20 mg-os fenntartó dózist alkalmaztak. A takrolimusz vérszint monitorozását rutinszerűen végezték (az első héten minden nap, a második héttől minden másnap), a dózist szükség szerint módosították, ha a vérkoncentráció kívül esett a terápiás céltartományon. A takrolimusz (C_0) mélykoncentrációját az esti gyógyszerbevétel után 12 órával, reggel 6 óra körül a reggeli dózis bevétele előtti vérvétel alapján teljes vérből határozták meg. A takrolimusz vérkoncentráció mérése a 4.3.2. alfejezetben ismertetett módon történt.

4.4.4 A donor/recipiens *CYP3A5* genotípus hatásának értékelése a takrolimusz farmakokinetikai paraméterek alakulására májtranszplantált betegeknél

A donor és a recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációk alapján létrehozott csoportok takrolimusz vérkoncentráció és dózis összehasonlítását GraphPad InStat (version 3.10; GraphPad Software) szoftverrel végeztük. A csoportok közötti különbségek vizsgálatára a Kruskal-Wallis variancia-analízist, ezt követően pedig a Dunn-féle többszörös összehasonlító tesztet használtuk. A $P < 0,05$ valószínűséggel jellemzett különbségeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

5 Eredmények

5.1 CYP mRNA expresszió mérési módszer optimalizálása

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 mRNA-expresszió mérésén alapul. A perifériás vér leukocitái megfelelő biológiai mintának számítanak a CYP enzim függő gyógyszer-metabolizáló képesség vizsgálatához, mivel minimálisan invazív módon, könnyen hozzáférhető, aktív RNS-szintézist mutatnak és tükrözik a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek májban mérhető aktivitását [Temesvári et al. 2012]. A máj CYP aktivitása és a leukociták CYP mRNA 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.

5.1.1 Folyadék-folyadék RNS extrakciós módszerek összehasonlítása

A kiváló minőségű, tiszta RNS kivonása fontos a génexpresszió érzékeny kvantitatív elemzéséhez. A szilárd fázisú extrakciós módszerek általában nagy tisztaságú RNS mintát állítanak elő; a folyadék-folyadék extrakció azonban hatékonyabbnak tűnt az alacsony koncentrációban expresszált transzkriptumok izolálásában. A magas hozamú és minőségű RNS kitermelés érdekében összehasonlítottam hat, kereskedelmi forgalomban kapható RNS extrakciós reagenst ugyanazon perifériás leukocita populáción (TRIzol™ reagens, TRI Reagent®, Trizolate Reagent®, RiboZol® RNS extrakciós reagens, RNAzol® RT reagens és NucleoZOL reagens). A RiboZol-reagens használatával kaptam a legmagasabb, kinyerhető totál RNS koncentrációt, míg az RNS kihozatal a másik öt reagens alkalmazásával szignifikánsan alacsonyabb volt ($P < 0,05$) (4. táblázat). Az RNS minták tisztaságának értékelésére a 260/280 és 260/230 nm-en mért abszorbancia arányokat alkalmaztuk, ideális tisztaságú minta esetén a 260/280 arány 2, illetve a 260/230 hányad a 2,0-2,2 tartományba esik.

Az összehasonlított reagensekkel kinyert RNS minták 260/280 aránya 2 körül volt, a RiboZol és az RNAzol® RT termékek kivételével, míg a 260/230 arány csak a TRIzol™, Trizolate Reagent® és a TRI Reagent® termékekkel izolált mintákban volt az elfogadható tartományban. A kinyert RNS mennyiségét és tisztaságát tekintve a TRIzol™, Trizolate Reagent® és a TRI Reagent® reagensek hasonlóan alkalmasnak tekinthetők, a pénzügyi vonzatot tekintve azonban a TRI reagens volt a legkedvezőbb választás (4. táblázat).

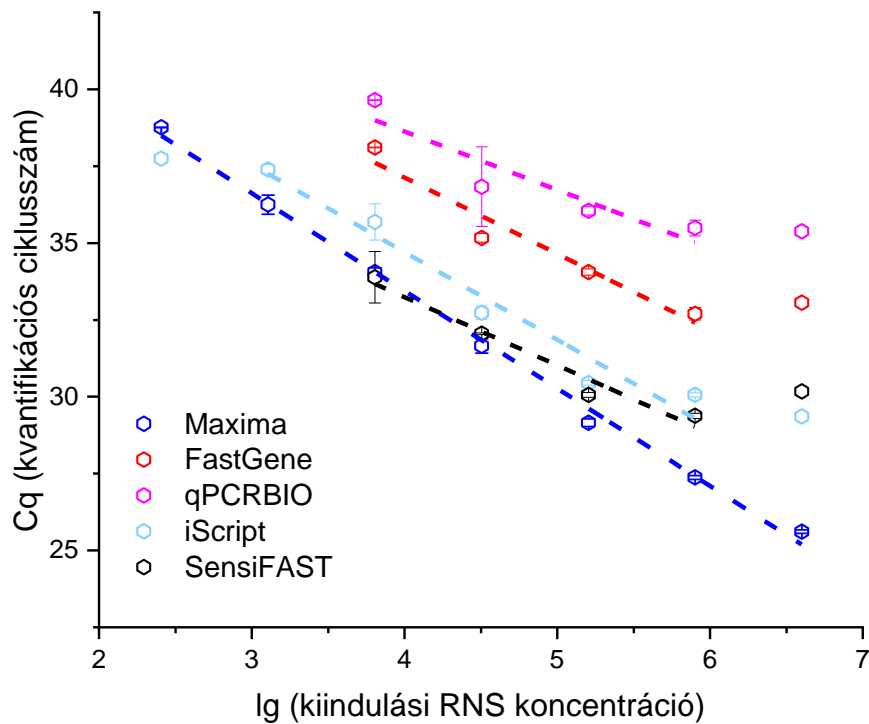
4. Táblázat: Folyadék-folyadék RNS extrakciós reagensek összehasonlítása. Déri és munkatársai táblázata alapján [Déri et al. 2020].

RNS extrakciós reagens	RNS koncentráció (ng/μl) ^a	260/280 arány ^a	260/230 arány ^a	200 ml reagens ára (€) ^b
TRIzol™ reagens	259,5±27,43	2,002±0,031	2,007±0,079	580
TRI Reagent®	235,7±11,94	2,006±0,034	2,115±0,007	182
Trizolate Reagent®	267,8±22,80	1,992±0,031	2,007±0,051	212
RiboZol reagens	336,2±37,55	1,870±0,101	1,640±0,321	230
RNAzol® RT reagens	250,8±41,34	1,795±0,163	1,150±0,330	185
NucleoZOL reagens	256,6±68,98	1,907±0,074	1,413±0,359	230

^a három extrakció átlaga ± standard deviáció ugyanabból a leukocita populációból. ^b a megjelenített árak a 2019-es év végi viszonyokat tükrözik

5.1.2 A reverz transzkripció és a qPCR módszer optimalizálása

Az alacsony CYP expressziós szintek méréséhez elengedhetetlen a rendkívül érzékeny és hatékony reverz transzkriptáz alkalmazása. Öt reverz transzkripció termékét (Maxima First Strand, qPCRBIO, FastGene Scriptase Basic, iScript és SensiFAST cDNS szintézis készletet) teszteltem a leukocitákban mérhető CYP3A4 mRNS expresszió alapján (8. ábra).



8. *Ábra* Öt reverz transzkripció termék összehasonlítása a leukocitákból mért CYP3A4 mRNS expresszió alapján. A kiindulási RNS minta „pool” 1:5 arányú hígítási sorát öt, az ábrán szereplő reverz transzkripció termékkel átírtuk, az így kapott cDNS mintákkal azonos körülmények közt végeztük el a CYP3A4 mRNS expresszió mérését qPCR módszerrel. A PCR reakciók során kapott Cq (kvantifikációs ciklus) értékeket ábrázoltam a logaritmizált kiindulási RNS koncentráció függvényében. A hatszögek és a hibásávok a három párhuzamos mérés átlagát és szórását jelölik (átlag \pm SD), a szaggatott vonalak pedig a lineáris koncentráció tartományra illeszkednek. [Déri et al. 2020]

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 μ g 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 legalacsonyabb, reakciónkénti 51,2 pg totál RNS mennyiség reverz-transzkripciója a CYP3A4 mRNS kimutatási határát nem érte el egyik cDNS szintézis készlet esetén sem.

A Maxima First Strand és az iScript cDNS szintézis készletekkel végzett reverz transzkripció esetén a CYP3A4 mRNS kimutatási határa 256 pg kiindulási RNS mennyiség volt, a qPCRBIO, FastGene Scriptase és SensiFAST cDNS szintézis készletek esetében a kimutatási határ még magasabb (6400 pg totál RNS) volt (5. táblázat). A cDNS szintézis linearitását elemezve az RNS koncentráció–Cq standard görbék korrelációs együtthatói (R^2) a Maxima First Strand, iScript és a SensiFAST cDNS szintézis termékek esetében magasabbak voltak mint 0,9. A qPCRBIO és a FastGene Scriptase cDNS szintézis készletek gyenge korrelációt mutattak (8. ábra; 5. táblázat). A reverz transzkripciót követő qPCR hatékonysága és ennek következtében a standard görbék meredeksége a Maxima First Strand és az iScript cDNS szintézis készleteket használva volt legközelebb az ideális elméleti értékekhez (-3,3, illetve 100%). A qPCRBio, a FASTgene Scriptase és a SensiFAST cDNS szintézis készletek használatával kapott cDNS templáton futtatott qPCR reakció hatékonysága jóval meghaladta az optimális tartományt. Mivel ugyanazokat a CYP3A4 PCR-komponenseket (primerek, próba, polimeráz és puffer) alkalmaztuk mind az öt cDNS-szintézis készlet összehasonlításának értékeléséhez, a reakció hatékonyság beli különbségei magának a reverz transzkripció terméknek tulajdoníthatók. A CYP3A4 mRNS expresszió mérés legszélesebb dinamikus tartományát a Maxima First Strand cDNS szintézis kit-tel előállított cDNS termék mutatta, ezért a továbbiakban a reverz transzkripció reakciókhoz ezt a kit-et használtuk.

5. Táblázat: Reverz transzkripció (RT) termékek összehasonlítása a CYP3A4 mRNS expresszió mérés Cq értékeire illesztett standard görbék alapján. Déri és munkatársai táblázata alapján [Déri et al. 2020]

reverz transzkripció termék	standard görbe meredekség ^a	R^2 (illesztési mutató) ^a	reakció-hatékonyság (%) ^a	detektálási határérték (pg RNS)	dinamikus tartomány	
					tapasztalt	gyártó által rögzített
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	-3,187±0,155	0,996±0,002	106,2±7,08	256	256 pg – 4 µg	1 pg – 5 µg

5. táblázat (folytatás)						
reverz transzkripció termék	standard görbe meredekség ^a	R ² (illesztési mutató) ^a	reakció-hatékonyság (%) ^a	detektálási határérték (pg RNS)	dinamikus tartomány	
					tapasztalt	gyártó által rögzített
qPCRBIO cDNA Synthesis Kit	-1,648±0,628	0,762±0,192	404,7±251,13	6400	6400 pg – 0,8 µg	4 pg – 0,1 µg
FastGene Scriptase Basic cDNA Kit	-1,881±0,307	0,775±0,049	249,3±70,23	6400	6400 pg – 0,8 µg	1000 pg – 5 µg
iScript™ cDNA Synthesis Kit	-2,849±0,052	0,958±0,007	124,8±3,35	256	1280 pg – 0,8 µg	0,1 pg – 1 µg
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	-2,218±0,231	0,937±0,037	182,4±32,81	6400	6400 pg – 0,8 µg	<1 µg

^a három mérés átlaga ± standard deviáció, azonos leukocita populációból TRI Reagent[®]-el izolált totál RNS három párhuzamosan elvégzett reverz transzkripciójának átlagából számítva

A Temesvári által leírt qPCR módszerek a CYP mRNS expresszió méréshez FAM fluorofórral jelölt próbákat alkalmaztak mind a referencia mind pedig a CYP gének méréséhez, ami nem tette lehetővé a multiplex reakciók kivitelezését. A ráfordított idő, munka és a minták, reagensek jelentős megtakarítása mellett a sikeres multiplex PCR-mérés a célgén relatív expressziójának pontosabb meghatározását is biztosítja. Ezért a CYPtest™ rendszer qPCR oligonukleotid komponenseit újraterveztük, a CYP és a referencia gének oligonukleotid próbáit különböző fluorofór jelzéssel (HEX és FAM) láttuk el (6. táblázat).

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 ampikon kizárólag a CYP mRNS-ről származó cDNS-ből származik,

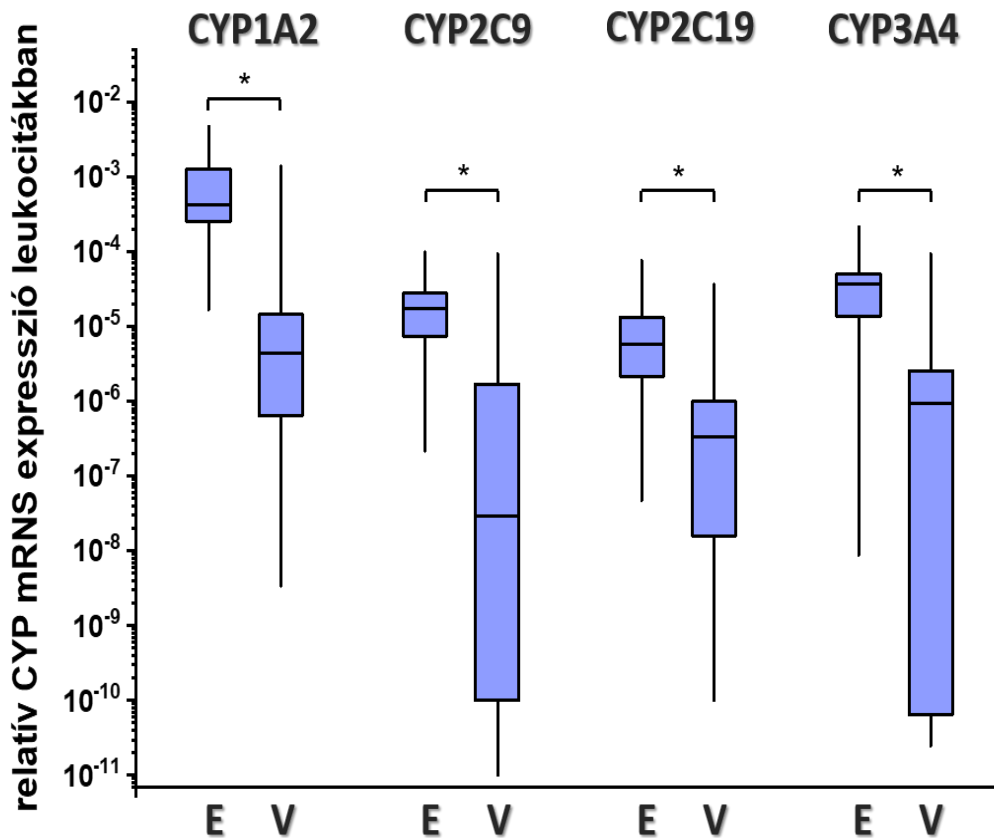
és az esetleges gDNS-szennyeződés nem torzítja a reakció eredményét, ugyanakkor nincs szükség DNáz-zal történő előzetes emésztésre. Az újratervezett primer-próba kombinációkat és az egyes géntermékek mennyiségi meghatározását ötszörös hígítási faktossal készült templat cDNS hígítási sor elemzésével vizsgáltuk. 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.

6. Táblázat A relatív mRNS expresszió mérés primer és próba oligonukleotid szekvenciái és az alkalmazott végkoncentrációk. Déri és munkatársai táblázata alapján [Déri et al. 2020]

Oligonukleotid	Szekvencia (5'-3')	Végkoncentráció
CYP1A2 „forward” primer	GTC AAT GAC ATC TTT GGA GCA G	200 nM
CYP1A2 „reverse” primer	CCT GCC AAT CAC AGT GTC C	200 nM
CYP1A2 próba	HEX-TGA CAC AGT CAC CAC AGC CAT CTC C-BHQ1	200 nM
CYP2C9 „forward” primer	AGA TAG GTA TTA AGG ACA TCA GC	200 nM
CYP2C9 „reverse” primer	CCA CTA TGG GTT TCA GGC	300 nM
CYP2C9 próba	HEX-ACC AAT CTC TCA AAG GTC TAT GGC-BHQ1	200 nM
CYP2C19 „forward” primer	ATC AGG ATT GTA AGC ACC C	400 nM
CYP2C19 „reverse” primer	TTC TCC AAA ATA TCA CTT TCC AT	400 nM
CYP2C19 próba	HEX-CCA CTA TCA TTG ATT ATT TCC CGG-BHQ1	200 nM
CYP3A4 „forward” primer	TGT CCT ACC ATA AGG GCT T	300 nM
CYP3A4 „reverse” primer	CAC AGG CTG TTG ACC A	300 nM
CYP3A4 próba	HEX-AGT ATG GAA AAG TGT GGG GCT T-BHQ1	300 nM
GAPDH „forward” primer	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	200 nM
GAPDH „reverse” primer	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	200 nM
GAPDH próba	FAM-TGG GGA AGG TGA AGG TCG- BHQ2	50 nM

5.2 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 (9. ábra). 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.

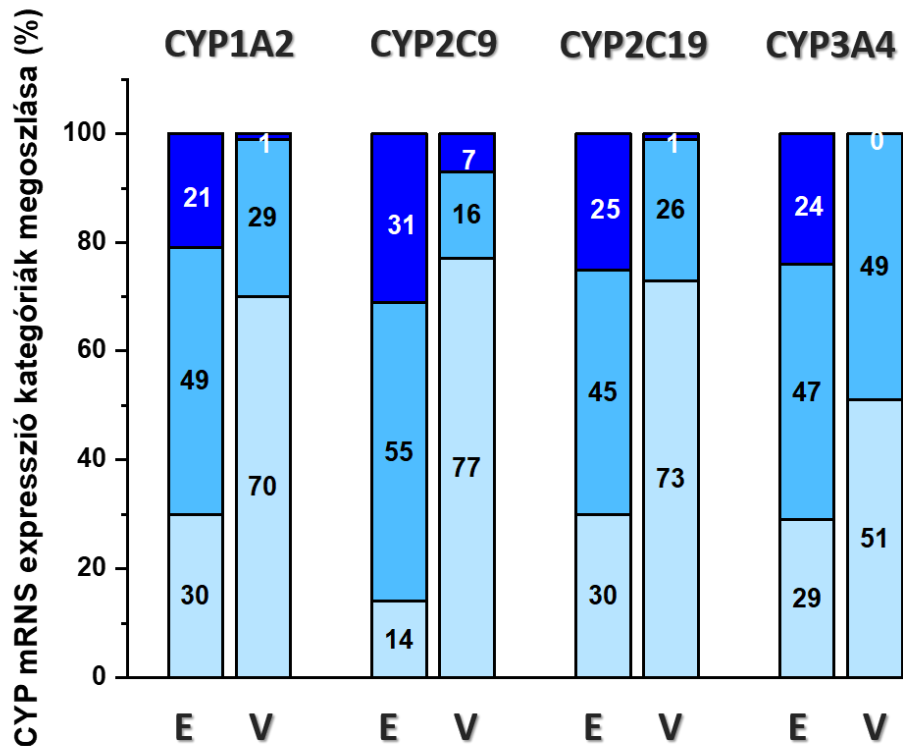


9. Ábra A CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS expressziója egészséges vesefunkciójú szervdonorok (E) (N=110) és végstádiumú vesebetegek (V) (N=105) leukocitáiban. A CYP mRNS szintek medián értékét a vízszintes vonal jelzi, a színezett „doboz” az első és a harmadik kvartilis közti tartományt, a függőleges karok pedig a minimális és a maximális értékeket mutatják. A csoportok közötti különbségeket Mann-Whitney U teszttel számítottuk ki. * $p < 0,0001$ [Déri et al. 2020]

Az egészséges vesefunkcióval rendelkező szervdonorok leukocitáiban mért CYP expresszió értékek megoszlása 2-3 nagyságrendnyi tartományban volt megfigyelhető, kivéve a CYP3A4 mRNS expressziót mely sokkal nagyobb (4 és fél nagyságrendnyi) donorok közti különbséget mutatott. A vesebetegek leukocitáiban mind a 4 vizsgált CYP mRNS expresszióban nagy volt az interindividuális 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 szervdonorokban megfigyelt expressziós értékekhez képest. A vesebetegek és a szervdonorok CYP expressziós medián értékei lényeges különbségeket mutattak ($P < 0,0001$), a legmagasabb mediánbeli különbség a CYP2C9 (600-szoros), a legalacsonyabb pedig a CYP2C19 (15-szeres) expresszióban volt megfigyelhető (9. ábra).

A kutatócsoport korábbi eredményei szerint perifériás leukocitákból mért CYP expresszió alapján becsülhető a májszövetben mérhető enzimaktivitás a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és a CYP3A4 enzimeknél [Temesvári et al. 2012]. 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 [Temesvári et al. 2012]. A szervdonorok és a végstádiumú vesebetegek CYP expressziójának összehasonlítása során szignifikáns különbségeket figyeltünk meg az alacsony, átlagos és magas CYP mRNS expresszálók arányában (χ^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) (10. ábra). 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%).



10. Ábra. Az **alacsony**, **átlagos** és **magas** CYP mRNS expressziót mutató egészséges vesefunkciójú szervdonorok (E) és a végstádiumú vesebetegek (V) aránya. A leukocitákban az alacsony, átlagos és magas CYP mRNS expresszió megállapításához a korábban meghatározott határértékeket használtuk: CYP1A2: (10^{-5} és 5×10^{-4}), CYP2C9: (2×10^{-6} és 10^{-5}), CYP2C19: (10^{-6} és 10^{-5}) és CYP3A4: (10^{-6} és 10^{-4}) [Temesvári et al. 2012]. Az oszlopokon feltüntetett számok százalékos értékben fejezik ki az adott expressziós kategória arányát. [Déri et al. 2020]

5.3 A CYP3A-státusz kapcsolata a takrolimusz vérkoncentrációval és dózisényvel szívátültetett betegeknél

5.3.1 A szívtranszplantált betegek CYP3A-státusza

A szívátültetésen átesett betegeknél a kaukázusi populációra jellemző, klinikailag releváns, funkcióvesztő *CYP3A5*3* polimorfizmust vizsgáltuk. *CYP3A5*3* alléllal 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%) [Zanger & Schwab 2013] (7. táblázat).

Azokat a recipienseket, akik hordozták a *CYP3A5*1* allélt, *CYP3A5* expresszálóknak tekintettük. A *CYP3A4* gén esetén két polimorf allélt (*CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*) határoztunk meg, amelyek szakirodalmi források alapján feltételezhetően befolyásolják a *CYP3A4* expresszióját. A szívtranszplantált betegek többsége (több mint 85%-a) homozigóta *CYP3A4*1*1* genotípussal rendelkezett, míg 13,3%-a heterozigóta volt (17 beteg hordozta a *CYP3A4*1*1B*, 14 pedig a *CYP3A4*1*22* genotípust). Egy beteg volt homozigóta a *CYP3A4*1B* polimorfizmusra nézve; *CYP3A4*22*22* genotípust azonban egyet sem találtunk a vizsgált 232 betegek közt (7. táblázat).

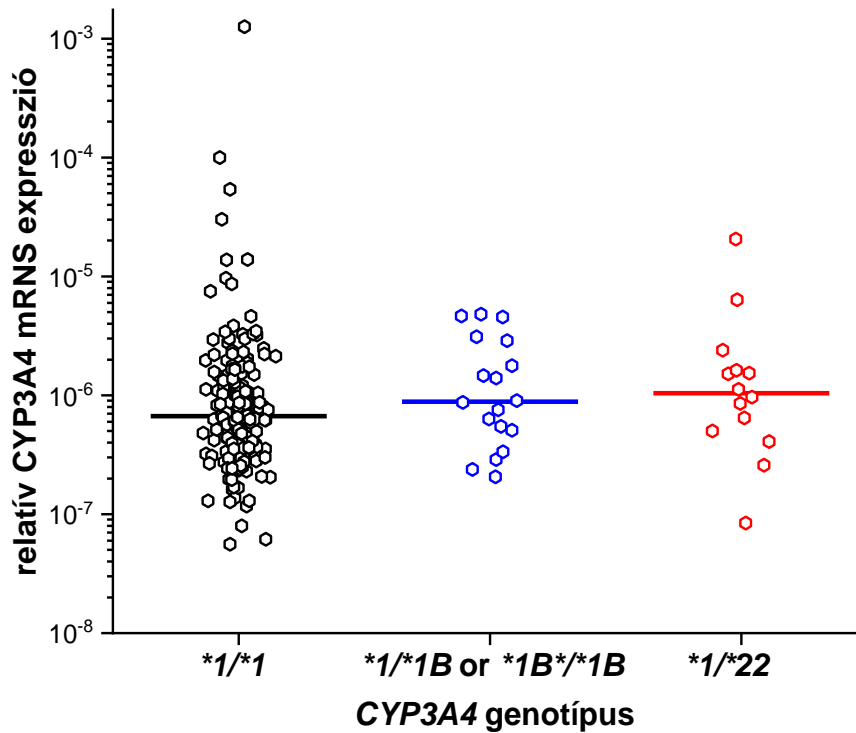
7. Táblázat: A vizsgált *CYP3A* allélok, genotípusok és mRNA expressziós kategóriák gyakorisága a szívtranszplantált betegek vizsgálati csoportjában és a kaukázusi populációban [Déri et al. 2021].

	N	Allél, genotípus és mRNA expresszió frekvencia (%)	
		szívtranszplantált betegek	kaukázusi populáció ^a
<i>CYP3A5</i> allél			
*3	426	91,8	88,0-97,0
<i>CYP3A4</i> allél			
*1B	19	4,1	3,0-5,0
*22	14	3,0	2,5-8,0
<i>CYP3A5</i> genotípus			
*1*1	2	0,9	0,0-3,4
*1*3	34	14,6	7,5-17,9
*3*3	196	84,5	82,0-92,5
<i>CYP3A4</i> genotípus			
*1*1	200	86,2	88,0-93,0
*1*1B	17	7,3	6,0-8,0
*1B*1B	1	0,4	0,0-4,0
*1*22	14	6,0	6,6-9,2
*22*22	0	0,0	0,0-0,7

7. táblázat (folytatás)			
		mRNS expresszió frekvencia (%)	
	N	szívtranszplantált betegek	kaukázusi populáció ^a
CYP3A4 mRNS expresszió			
alacsony	130	56,0	40,2
átlagos	100	43,1	47,3
magas	2	0,9	12,5

^aAz allélfrekvenciák a kaukázusi populációban Zanger és Schwab alapján [Zanger & Schwab 2013]. A kaukázusi populáció genotípus gyakoriságait több különböző publikáció alapján rögzítettem [Bruckmueller et al. 2015, Csikány et al. 2021, Kurzawski et al. 2014, Plummer et al. 2003, Saiz-Rodriguez et al. 2020]. A kaukázusi populációra vonatkozó CYP3A4 mRNS expressziós kategóriákat a Csikány és munkatársai által leírtakkal hasonlítottam össze [Csikány et al. 2021].

A genetikai kapcsoltság a CYP3A lokuszban egy már jól jellemzett jelenség [Dally et al. 2004], vizsgálataink alapján is szignifikáns kapcsoltságot találtunk a *CYP3A4*1B* és a *CYP3A5*1* allélokra jellemző SNP-k között (rs2740574 és rs776746) a 232 szívtranszplantált betegnél (D' : 0,758; LOD: 9,42). A *CYP3A4*22*, illetve a *CYP3A4*1B* allélok, melyeknek csökkent, illetve fokozott CYP3A4 génexpressziós hatást tulajdonítanak [Tornio & Backman 2018], 32 betegnél azonosítottunk. Nem találtunk összefüggést a *CYP3A4* genotípus csoportok és a CYP3A4 mRNS expresszió között, valószínűleg a polimorf *CYP3A4* allélok alacsony gyakorisága miatt (*CYP3A4*1B*: 4,09%; *CYP3A4*22*: 3,02%) vagy egyéb, nem-genetikai tényezők miatt, melyek elfedhették a *CYP3A4* genotípus mRNS expresszióra gyakorolt hatását szívtranszplantált betegeknél (11. ábra). A CYP3A4 mRNS szintek lényeges, egyének közti különbségei azonban nem magyarázhatók kizárólag az expressziót befolyásoló *CYP3A4* allélokkal; ezért a betegek máj CYP3A4 aktivitását a páciensek leukocitáinak CYP3A4 mRNS szintjéből becsültük meg, a betegeket alacsony, átlagos és magas expressziójú csoportokba sorolva (7. táblázat). A betegek több mint fele (56%) alacsony CYP3A4 mRNS 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).

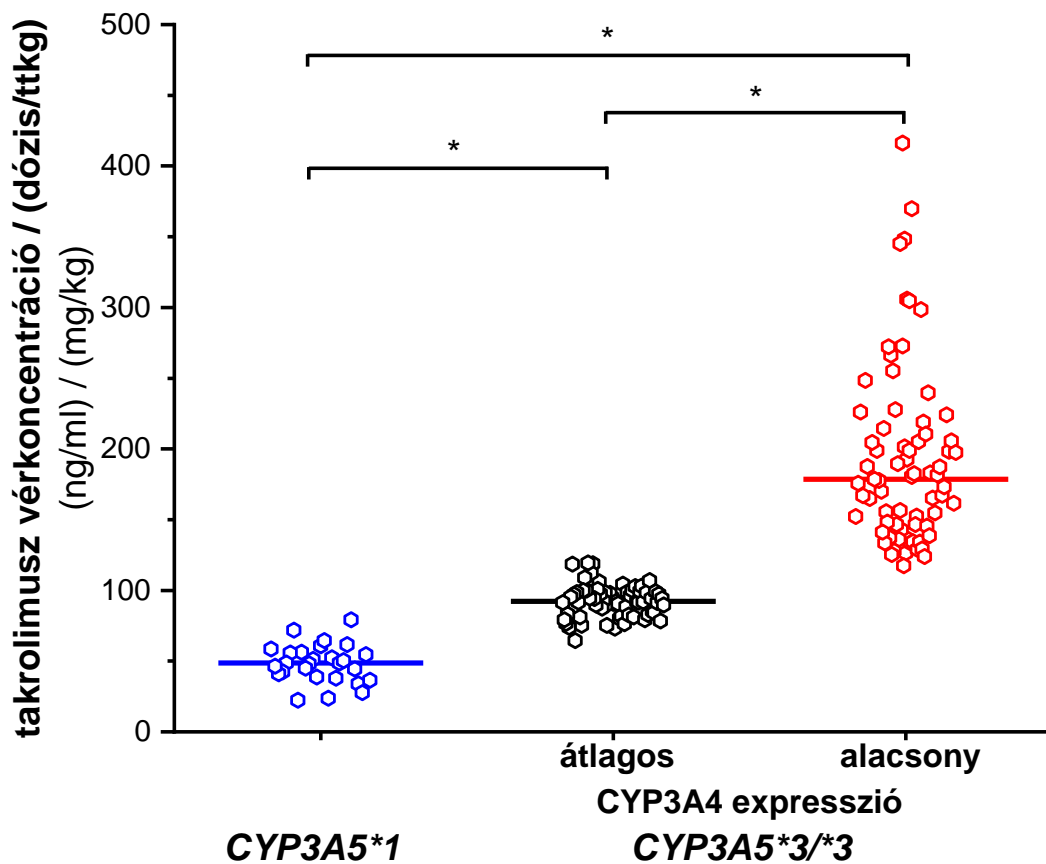


11. Ábra: A *CYP3A4* genotípus hatása a *CYP3A4* mRNS expresszióra szívátültetett betegeknél a korai posztoperatív időszakban, 2 nappal a transzplantáció után [Déri et al. 2021].

5.3.2 A szívátültetett 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 recipiensnek 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* mRNS 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* mRNS expressziót mutatók. A 163 recipiens közt nem volt olyan beteg, aki magas szinten expresszálta volna a *CYP3A4* mRNS-t.

A szívátültetett betegek CYP3A-státusza, valamint a dózissal és a testtömeggel normalizált takrolimusz vérkoncentrációja között jelentős összefüggést mutattunk ki (12. ábra). A CYP3A5 enzimet expresszáló betegeknél volt megfigyelhető a legalacsonyabb takrolimusz vérkoncentráció (C_0/D); szignifikánsan alacsonyabb volt, mint azoknak a betegeknak a C_0/D értékei, akik nem rendelkeztek működőképes CYP3A5 enzimmel.

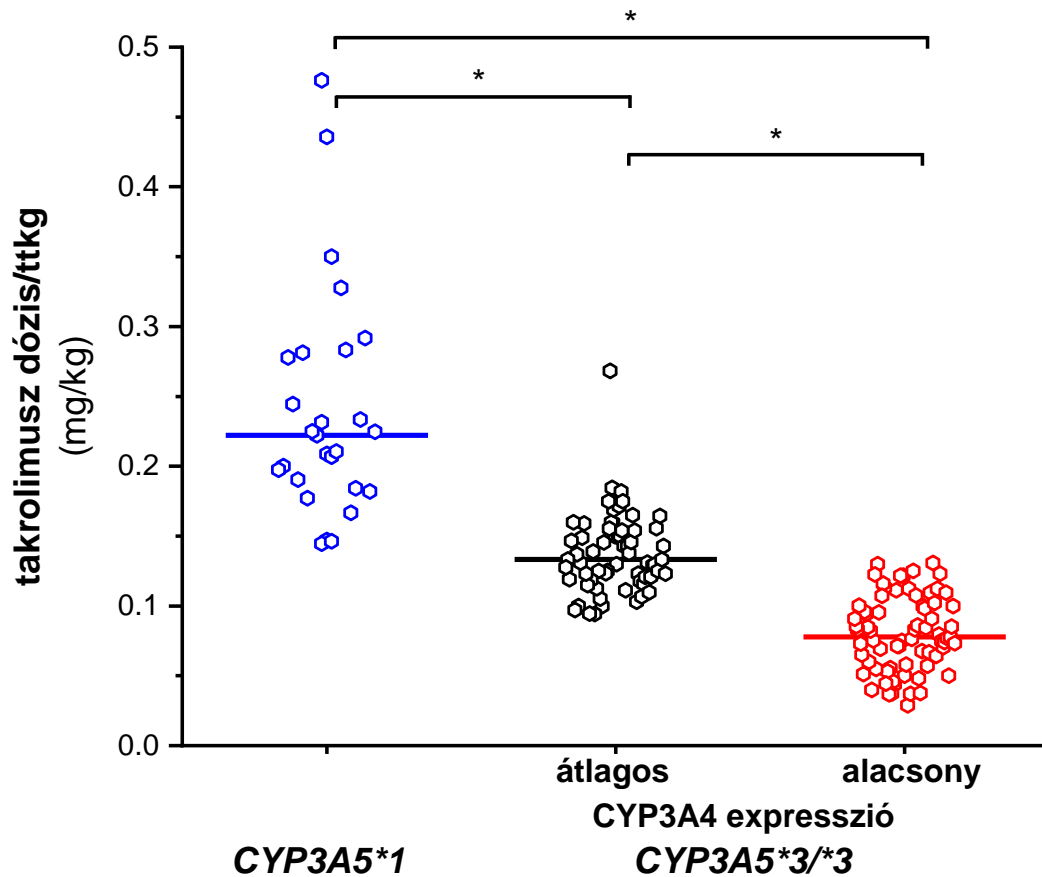


12. Ábra: A betegek CYP3A státuszának (CYP3A5 genotípus és CYP3A4 expresszió) hatása a dózissal normalizált takrolimusz vérkoncentrációra szívátültetett betegeknél a korai posztoperatív időszakban (15 nappal a transzplantációt követően). A diagram 12 órával az esti takrolimusz bevétel utáni vérszintet, a takrolimusz mélykoncentrációt ábrázolja ((ng/ml)/(mg dózis/testtömeg kg)). A vonalak a különböző CYP3A csoportok medián értékeit jelzik. **CYP3A5** enzimmel rendelkezők, valamint a CYP3A5 enzim nélküli **átlagos** és **alacsony** CYP3A4 expressziós csoport * $P < 0,0001$ [Déri et al. 2021]

A takrolimusz vérkoncentrációja az átlagos CYP3A4 mRNS szinttel rendelkező, de CYP3A5 enzimhiányos betegekben körülbelül kétszerese volt, míg az alacsony CYP3A4 mRNS expressziójú betegek esetén négyszerese volt a CYP3A5 enzimet expresszáló betegek vérszintjének (CYP3A5 expresszálók: $48,3 \pm 13,57$ (ng/ml)/(mg/ttkg); átlagos CYP3A4 expresszálók: $92,6 \pm 11,33$ (ng/ml)/(mg/ttkg); alacsony CYP3A4 expresszálók: $192,5 \pm 63,60$ (ng/ml)/(mg/ttkg); N=163, P <0,0001).

A viszonylag alacsony szórás mind a CYP3A5 expresszáló csoportban, mind pedig az átlagos CYP3A4 expressziót mutató csoportban azt jelezte, hogy a csoportokon belül a betegek takrolimusz „clearance” értéke hasonló volt. Azonban az alacsony CYP3A4 mRNS szintet mutató betegeknel a normalizált takrolimusz vérszint értékek szórása igen magas volt. Ez arra enged következtetni, hogy a kezdeti takrolimusz terápia optimalizálása az alacsony CYP3A4 expressziót mutató betegeknel nagy kihívást gördített a klinikusok elé. A szívtranszplantált betegek kezelési rendje szerint a korai posztoperatív időszakban a célzott C_0 vérkoncentráció tartomány 10-15 ng/ml közé esik. A terápiás vérszint tartomány eléréséhez szükséges takrolimusz dózis szignifikáns összefüggést mutatott a recipiensek CYP3A-státuszával. A működőképes CYP3A5 enzimmel rendelkező (CYP3A5*1 allélt hordozók) pácienseknel nagyobb takrolimusz dózissra volt szükség a terápiás vérkoncentráció eléréséhez, mint a CYP3A5 enzimmel nem rendelkező betegeknel (CYP3A5*3/*3) (CYP3A5 expresszálók: $0,240 \pm 0,081$ mg/ttkg; átlagos CYP3A4 expresszálók: $0,138 \pm 0,0283$ mg/ttkg; alacsony CYP3A4-expresszálók: $0,080 \pm 0,0266$ mg/testtömeg-kg; N=163, P <0,0001) (13. ábra).

Figyelembe véve a takrolimusz kezdő dóziséra vonatkozó klinikai protokollt, az ajánlott 0,1 mg/testtömeg kg dózis egyetlen CYP3A-státusz kategória esetében sem volt optimális. A takrolimusz dozírozás pontosítását teszi lehetővé a recipiens CYP3A-státuszához való igazítás. A működőképes CYP3A5 enzimet eredményező vad típusú CYP3A5*1 allélt hordozó recipienseknel a takrolimusz cél vérkoncentrációhoz szignifikánsan magasabb (2,4-szeres) dózissra volt szükség.



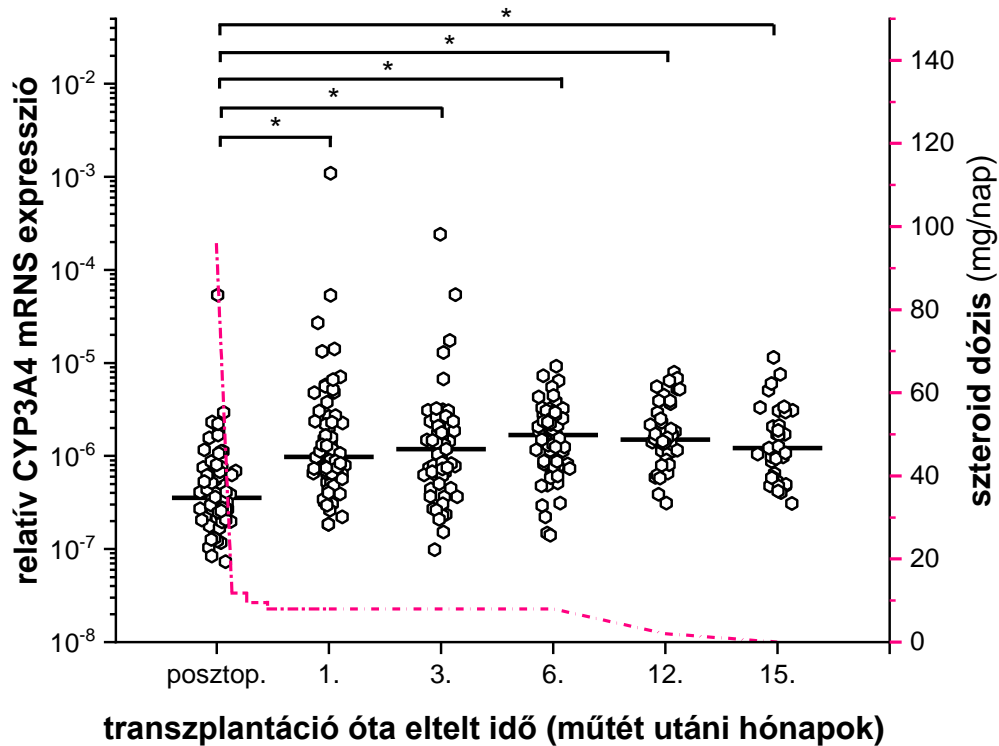
13. *Ábra* A betegek CYP3A státuszának (CYP3A5 genotípus és CYP3A4 expresszió) hatása a terápiás vérkoncentráció eléréséhez szükséges takrolimusz dózisa szívatültetett betegeknél a korai posztoperatív időszakban (15 nappal a transzplantációt követően). A vonalak a különböző CYP3A csoportoknál alkalmazott takrolimusz dózisok medián értékeit jelzik. **CYP3A5** enzimmel rendelkezők, valamint a CYP3A5 enzim nélküli **átlagos** és **alacsony** CYP3A4 expressziós csoport *P <0,0001 [Déri et al. 2021].

A CYP3A5*3/*3 genotípussal rendelkező átlagos CYP3A4 expressziót mutató betegek esetében a dózisingény 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.

Összefoglalva elmondható, hogy a recipiensek CYP3A-státusza és a takrolimusz dózissal és testtömeggel normalizált vérkoncentráció között szignifikáns összefüggés mutatható ki, ami alapján az optimális terápiás vérkoncentráció eléréséhez szükséges dózis meghatározható.

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

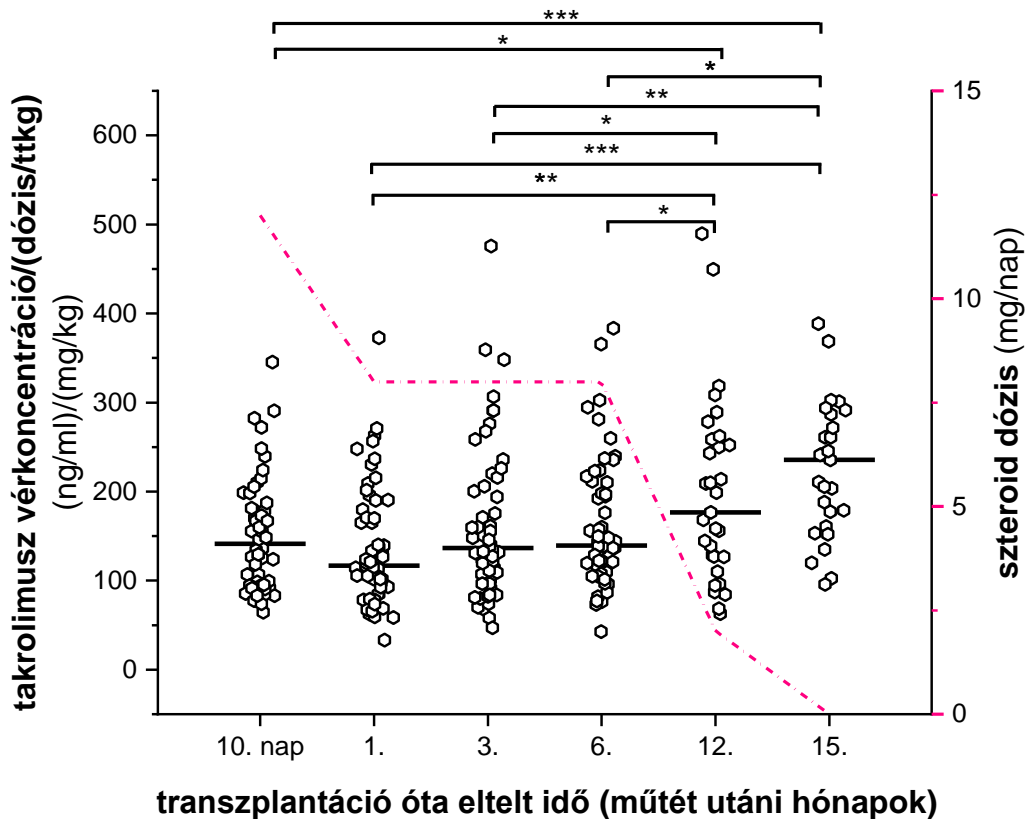
78 szívtranszplantált betegnél vizsgáltuk a CYP3A-státusz (CYP3A4 expresszió és CYP3A5 genotípus) hatását a takrolimusz expozíciójára a transzplantációt követő 15 hónapban. A recipiensek CYP3A4 mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a transzplantációhoz legközelebb eső időpontban (a műtét utáni második napon), mint bármely későbbi időpontban (1, 3, 6, 12 és 15 hónap) ($P < 0,0001$) (14. ábra). A transzplantáció idején a betegek többsége (85%) alacsony szintű CYP3A4 mRNS expressziót mutatott, ami a CYP3A4 szubsztrátok szempontjából gyenge metabolizáló képességet jelent; ezen kívül a legalacsonyabb és a legmagasabb CYP3A4 mRNS expresszió között több mint három nagyságrendnyi különbség volt megfigyelhető. Habár a transzplantáció után 1 és 3 hónappal még mindig széles tartományt ölelt fel a betegek CYP3A4 expressziós szintje, a recipienseknek már több mint a fele az átlagos CYP3A4 expresszáló kategóriába esett. A longitudinális vizsgálat későbbi időpontjaiban (6 és 12 hónap) a CYP3A4 expresszió tartománya mindössze egy-másfél nagyságrendnyire szűkült, és 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. A transzplantációt követő 15 hónapos periódus során kialakuló CYP3A4 expressziót a genetikai polimorfizmuson túl, nem-genetikai tényezők is befolyásolják, mint például a kortikoszteroid terápia, mely fontos faktornak bizonyult, ezért a metilprednizolon dózisait is megjelenítettem a CYP3A4 mRNS szintek ábrázolásával párhuzamosan (14. ábra). Mindenképp szeretném megjegyezni, hogy a transzplantáció utáni 12 és 15 hónapos időpontokban a CYP3A4 mRNS expresszió adatok csak hiányosan álltak rendelkezésünkre, ugyanis a vizsgálati csoport korábban transzplantált pácienseinek egy része, a személyes konzultációról a COVID-19 járványhelyzetre való tekintettel áttért az online kontroll vizsgálatra, így vérminta levételre nem volt lehetőségünk.



14. *Ábra:* CYP3A4 mRNA expresszió szívtranszplantált recipienseknél a műtétet követő 15 hónapos időszakban. A szaggatott vonal a kortikoszteroid napi dózisát jelöli * $P < 0,0001$ [Déri et al. 2021]

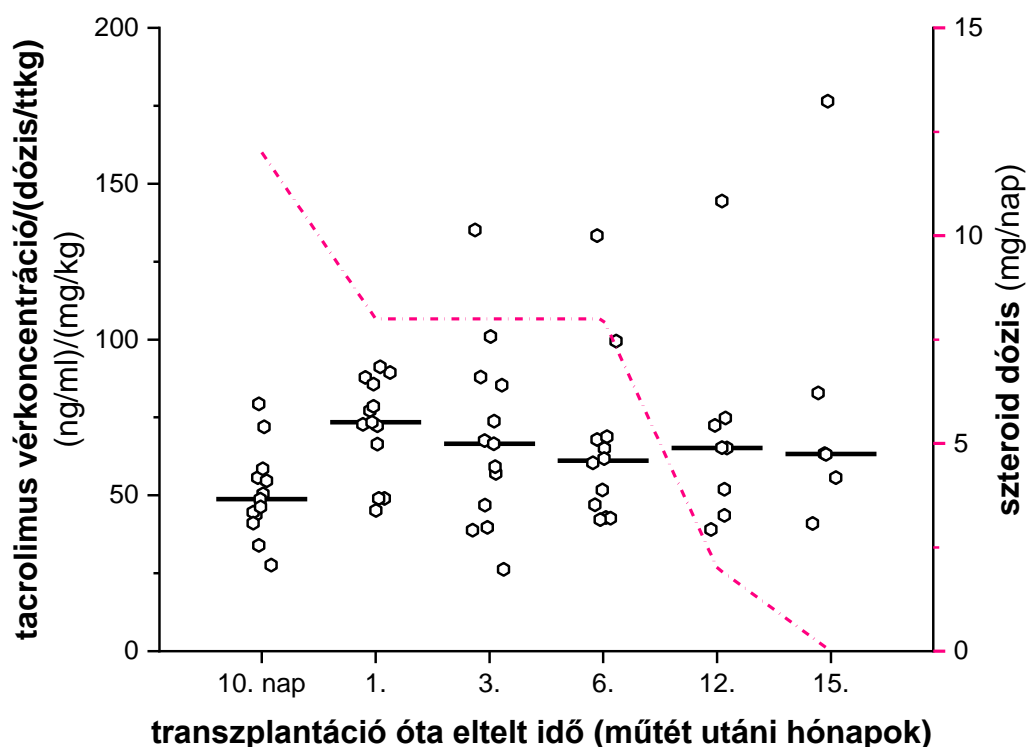
Mivel a CYP3A5 enzimnek domináns szerepe van a takrolimusz metabolizmusában, a takrolimusz C_0 koncentrációjának (dózissal és testtömeggel normalizált) változását külön-külön követtük a CYP3A5 expresszáló és a CYP3A5 enzimhiányos recipiensekben ($N = 13$, $N = 65$) (15. és 16. ábra). A takrolimusz-kezelés általában a transzplantációt követő 5. napon kezdődött; ezért az első vérmintavétel időpontja melyből meghatároztuk a perioperatív CYP3A4 mRNA 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 (15. ábra); 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 (15. ábra).



15. Ábra: A dózissal normalizált takrolimusz vérkoncentráció a *CYP3A5*3/*3* genotípussal rendelkező (*CYP3A5* enzimhiányos) szívtranszplantált recipienseknél a műtétet követő 15 hónapos időszakban. A szaggatott vonal a kortikoszteroid napi dózisát jelöli * $P < 0,0001$ [Déri et al. 2021].

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 (16. ábra). A 16. ábrán látható 4 kiugróan magas [125 (ng/ml)/(mg dózis/testtömeg-kilogramm)] koncentráció-érték feletti vérszint közül 3 érték ugyanahhoz a pácienshez tartozott, akinek a *CYP3A4* mRNS expressziója az utánkövetéses vizsgálat során végig rendkívül alacsony volt, elképzelhető, hogy a *CYP3A5* enzim transzkripciója is hasonlóan csökkent átíródással zajlott.



16. Ábra: A dózissal normalizált takrolimusz vérkoncentráció a *CYP3A5*1* allélt hordozó (*CYP3A5* enzimmel rendelkező) szívtranszplantált recipienseknél a műtétet követő 15 hónapos időszakban. A szaggatott vonal a kortikoszteroid napi dózisát jelöli [Déri et al. 2021].

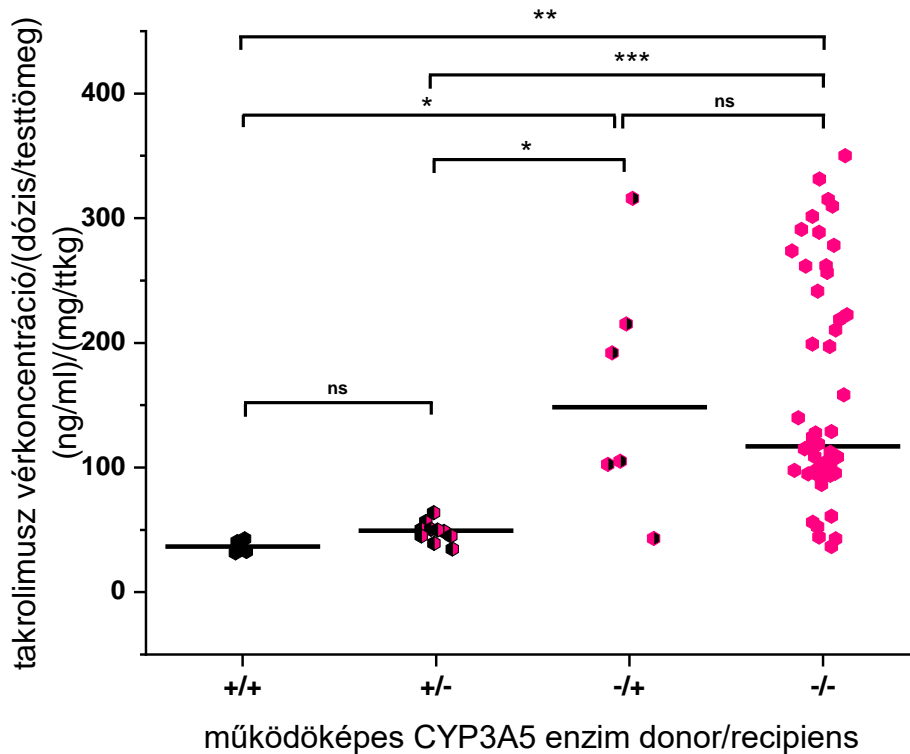
5.4 A donor és recipiens *CYP3A5* genotípus meghatározásának klinikai jelentősége májtranszplantált betegeknél

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 [Monostory et al. 2015]. *CYP3A5*3/*3* genotípussal rendelkező átlagos *CYP3A4* mRNA 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 graffal transzplantáltak, lényeges (kb. 50%) dózis csökkentésre volt szükség (0,047 mg/kg takrolimusz, $P < 0,001$), míg a magas *CYP3A4* expressziót mutató graffal 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 [Monostory et al. 2015].

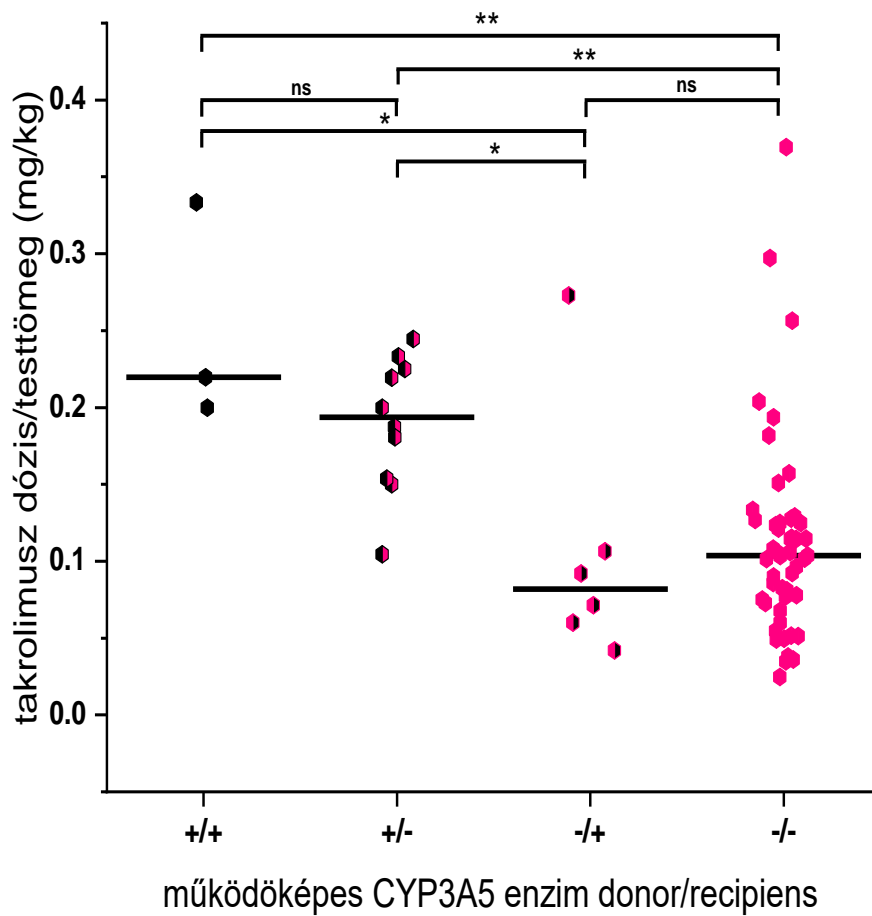
A takrolimusz metabolizmusa azonban nem kizárólag a máj CYP3A enzimeitől függ, a felszívódott hatóanyag egy része már a bélben, a vékonybél CYP3A enzimeinek segítségével átalakul [Brunet et al. 2019, Schutte-Nutgen et al. 2018]. Májtranszplantáció esetén nincs teljes szakmai egyetértés az orális takrolimusz készítmények farmakokinetikájával kapcsolatban. Egyes vizsgálatok csak a graft takrolimusz metabolizáló kapacitását találták meghatározónak [Provenzani et al. 2011, Yu et al. 2006], míg más tanulmányok a recipiens vékonybél metabolikus kapacitását is lényeges tényezőként állapították meg [Buendia et al. 2015, Uesugi et al. 2006].

Az imént említett eredmények hatására, a szakirodalomban jelentős takrolimusz metabolizálóként leírt 2 szerv (a máj és a bél) genotipizálásával vizsgáltuk a donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombináció hatását a takrolimusz vérkoncentrációra, valamint a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózistra májtranszplantáción átesett betegeknél (17 és 18. ábra). A dózissal és testtömeggel 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 elhanyagolható a takrolimusz vérkoncentrációjára nézve (17. ábra).



17. Ábra: A dózissal és testtömeggel normalizált takrolimusz vérkoncentráció a különböző donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációk függvényében. Nincs *CYP3A5* enzim: *CYP3A5**3/*3 genotípus; van *CYP3A5* enzim: *CYP3A5**1/*3 vagy *CYP3A5**1/*1 genotípus. -/- (N=49) donornak nincs/recipiensnek nincs; -/+ (N=6) donornak nincs/recipiensnek van; +/- (N=10) donornak van/ reciapiensnek nincs; +/+ (N=4) donornak van/reciapiensnek van *CYP3A5* enzime. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; ns = nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget. Csikány és munkatársai ábrája alapján [Csikány et al. 2021]

A donor/reciapiens *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 (18. ábra).



18. ábra A terápiás vérszint beállításához szükséges takrolimusz dózis a különböző donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációk esetén. Nincs *CYP3A5* enzim: *CYP3A5**3/*3 genotípus; van *CYP3A5* enzim: *CYP3A5**1/*3 vagy *CYP3A5**1/*1 genotípus. -/- (N=49) donornak nincs/recipiensnek nincs; -/+ (N=6) donornak nincs/recipiensnek van; +/- (N=10) donornak van/ reciapiensnek nincs; +/+ (N=4) donornak van/reciapiensnek van *CYP3A5* enzime. *P <0,05; ** P <0,001; ns = nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget.

6 Megbeszélés

A személyre szabott gyógyszeres kezelés megvalósításához elengedhetetlen, hogy információkat szerezzünk a betegek gyógyszer-metabolizáló kapacitásáról [Shah & Shah 2012, Shah & Smith 2015]. A CYP1–3 családokba tartozó májenzimek, elsősorban a CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2 és CYP2B6 nagymértékben hozzájárulnak a gyógyszerek biotranszformációjához; ezért a máj CYP aktivitására vonatkozó minden információ komoly jelentőséggel bír a gyógyszer-metabolizáló képesség becslése szempontjából [Zanger & Schwab 2013]. A CYP státusz és a gyógyszer-metabolizáló képesség becslésének első lépése a klinikailag releváns CYP allélok azonosítása, amelyek hiányzó, csökkent, növekedett vagy akár ultragyors enzimaktivitást és ezáltal az átlagostól eltérő metabolizmust eredményeznek [Waring 2020, Zhou et al. 2017]. A nem-genetikai tényezők következtében a hepatikus CYP aktivitások átmeneti csökkenése (vagy emelkedése) részben detektálható a leukocitákban mérhető CYP expresszióból. A CYP expresszió és aktivitás a leukocitákban nagyságrendekkel alacsonyabb, mint a májban, a kutatócsoport korábbi eredményei azonban igazolták, hogy a perifériás vér leukocitáiban a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 enzimek mRNS expressziója tükrözi a máj aktivitását [Temesvári et al. 2012]. Azonban azt meg kell jegyezni, hogy a perifériás vér leukocitái nem megfelelő biomarkerek a máj CYP2B6 és CYP2D6 enzimaktivitásának értékeléséhez, mivel nincs összefüggés a máj aktivitása és a leukocita mRNS expresszió között [Temesvári et al. 2012]. A CYP3A-szubsztrátok esetén felmerülhet a kérdés a CYP3A5 enzim érdemi szerepéről, azaz hogy a betegek CYP3A-szubsztrát-metabolizáló képessége inkább a CYP3A4, vagy a CYP3A5 aktivitásának tulajdonítható. Ugyanis a CYP3A4 mennyisége a máj CYP3A-készletében lényegesen meghaladja a CYP3A5 enzim mennyiségét (85%, illetve 5%) [Ohtsuki et al. 2012], másrészt a kaukázusi (fehér) populációban általában a CYP3A5 enzim hiányát eredményező *CYP3A5*3* allél van csak jelen az egyénekből (*CYP3A5*3* allélfrekvencia: 88–97%) [Zanger & Schwab 2013], így a CYP3A5 expresszió csak azokra korlátozódik, akik hordozzák a funkcionális vad típusú *CYP3A5*1* allélt; harmadrészt pedig a CYP3A5 enzim aktivitásának szubsztrát-specifitása nem olyan széles mint a CYP3A4 enzimnek. A funkcionális CYP3A5 (*CYP3A5*1* allél) jelenléte nem befolyásolja számos CYP3A szubsztrát (klonazepám, fluvasztatin, pravasztatin, karbamazepin) farmakokinetikai viselkedését, míg mások,

például a takrolimusz CYP3A5 enzim katalizálta metabolizmusa lényegesen intenzívebb, mint a CYP3A4 enzimhez köthető „clearance”; ezért a *CYP3A5*1* allélt hordozó betegek a terápiás vérkoncentráció eléréséhez magasabb takrolimusz dózist igényelnek, mint a *CYP3A5*3/*3* genotípusú betegek. Ez egyben azt is jelenti, hogy a magas takrolimusz-metabolizáló képesség becsléséhez elegendő a *CYP3A5*1* azonosítása, nincs szükség további CYP3A5 expressziós mérésekre [Monostory et al. 2015].

6.1 A CYP génexpresszió mérési módszer optimalizációja alacsony expresszió kimutatására

A CYP enzimek genetikai polimorfizmusai, mint permanens variációk és a CYP expresszió tranziens változásainak kimutatása megkönnyítheti a magas kockázatú betegek azonosítását [Monostory et al. 2015, Tóth et al. 2015, Tóth et al. 2016, Tóth et al. 2017]. Károsodott veseműködésű betegek leukocitáiban az urémiás toxinok potenciális felhalmozódása miatt a CYP gének alacsony expressziót mutatnak. Ezért a qPCR technikát alkalmazó CYP expresszió mérés munkafolyamatainak lépései (RNS extrakció, reverz transzkripció, valamint a CYP gének qPCR mérése) megkövetelték a Temesvári és munkatársai által leírt módszer finomítását [Temesvári et al. 2012]. A génexpresszió elemzéséhez az RNS elkülönítése a sejt egyéb makromolekuláitól (DNS, fehérjék) folyadék-folyadék, vagy szilárd fázisú extrakcióval kritikus fontosságú ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű és minőségű RNS-t nyerjünk ki a biológiai mintából. Rendelkezésünkre állnak különféle szilárd fázisú extrakciós módszerek, amelyekkel nagy tisztaságú RNS mintákat lehet izolálni. A szilárd fázisú extrakció olyan előnyei mellett, mint például a jó reprodukálhatóság, a veszélyes vegyi anyag-felhasználás csökkentése, valamint az egyszerű automatizálás, az RNS kitermelés alacsony hozama egy jelentős hátrány [Ali et al. 2017, Thatcher 2015]. Szilárd fázisú módszerrel gyakran nincs esély az alacsony koncentrációban kifejezett cél RNS szekvencia kinyerésére. A folyadék-folyadék extrakció általában lényegesen nagyobb mennyiségű RNS-t eredményez, mint a szilárd fázisú extrakciós módszerek [Tesena et al. 2017]; nagy tisztaságú RNS-minták előállításához azonban szükséges a legmegfelelőbb folyadék-folyadék extrakciós módszer megfontolt kiválasztása. A leggyakoribb folyadék-folyadék extrakciós módszerek a fenol - guanidín-tiocianát reagens párt használják, kloroform hozzáadással indukált fázis-szétválasztással vagy anélkül.

Bár a jelen vizsgálatban alkalmazott RNS extraháló termékek ugyanazokat a lépéseket követték, mint a vizes fázisból származó RNS kicsapása 2-propanollal, valamint az RNS etanollal történő tisztítása [Chomczynski et al. 2013, Rio et al. 2010, Shukla et al. 2017], a leukociták RNS-hozama és tisztasága eltérő volt. A RiboZol[®] reagenssel volt kinyerhető a legnagyobb mennyiségű RNS; a TRIzol[™], Trizolate Reagent[®] és TRI Reagent[®] reagenssekkel pedig a legalacsonyabb szennyeződési rátával extraháltuk az RNS-t. Minden paramétert (RNS kitermelés, tisztaság és költségvonzat) összevetve a TRI Reagent[®] alkalmazása volt a legelőnyösebb a pénzügyi ráfordítást is figyelembe véve. A gDNS (genomi) szennyeződések az RNS mintákban jelentősen befolyásolhatják a qPCR kimenetelét, ami a vizsgálni kívánt mRNS expresszió „felülméréséhez” és pontatlan mRNS expressziós eredményekhez vezethet. A gDNS szennyeződése megbecsülhető PCR vizsgálatokkal, (kihagyva a reverz transzkripció lépését) párhuzamosan a reverz transzkripciót követő qPCR lépésekkel; azonban ez a kiegészítő vizsgálat költséges, és a korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló RNS minta addicionális felhasználása sem elhanyagolható tényező. Alternatív módszerként megemlíteném az RNS-minták (RNáz-mentes) DNáz-emésztését a reverz transzkripció és a qPCR lépések előtt. Bár a DNáz kezelés, és az ezt követő DNáz inaktiválás jelentősen csökkentheti a gDNS szennyeződést, ezek a további lépések jelentősen meghosszabbítják a minta előkészítés időtartamát. A gDNS szennyezésre érzéketlen reakció összeállítása a megfelelő oligonukleotid primerek tervezésével idő- és reagens-takarékos alternatív módszer, amely számos eukarióta génre alkalmazható [Kuang et al. 2018]. Ha az oligonukleotid primer szekvenciát az eukarióta gén exon–exon határára tervezzük, vagy a „forward” és a reverz primerek által kijelölt szekvencia egy nagy intron régiót is tartalmaz, akkor az amplifikációhoz szükséges templátot kizárólag a reverz transzkripció során átíródott cDNS-ből biztosíthatjuk, ezért a gDNS szennyezés nem fogja zavarni a génexpresszió elemzését. Mivel a *CYP* gének és a referencia gén *GAPDH* multi-exon gének, ezért meg tudtuk tervezni a megfelelő-gDNS szennyezésre érzéketlen qPCR méréseket.

Az RNS templát reverz transzkripciója egy másik eszenciális lépés a génexpresszió kvantitatív vizsgálata során. A reverz transzkriptáz enzim általánosságban széles dinamikus tartományban mondható hatékonynak, képes cDNS-é átírni mind a magas mind pedig az alacsony koncentrációban lévő kiindulási RNS templátot [Levesque-Sergerie et al. 2007, Okello et al. 2010, Picard-Meyer et al. 2015]; a gyártók specifikációi

azonban csupán a kiindulási minta teljes RNS tartalmára vonatkozóan tájékoztatnak, és nem a specifikus templát szekvencia mennyiségére vonatkozóan, amelyet az adott enzim képes átírni. Ezenkívül a gyártók tájékoztatói ritkán adnak információt arról, hogy a reverz transzkripció termék közvetlenül alkalmazható-e a qPCR-hez, vagy a reverz transzkripció reakció után szükséges-e valamilyen minta feldolgozás pl. hígítás vagy tisztítás [Okello et al. 2010]. A CYP mRNS expresszió vizsgálat során a reverz transzkriptáz fő alkalmazhatósági kritériuma a széles dinamikus tartomány és a közvetlen qPCR felhasználhatóság. Mind az öt, a jelen vizsgálatban alkalmazott cDNS szintetizáló termék módosított MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverz transzkriptáz enzimet tartalmazott, amely a szakirodalom szerint magasabb cDNS szintézis sebességre képes, mint az AMV (Avian Myeloblastosis Virus) enzimet tartalmazó termékek [Pfaffl 2004, Yasukawa et al. 2008]. Minden általunk vizsgált cDNS szintézis készítmény ugyanazt a primer kötődési stratégiát alkalmazza a véletlenszerű hexamer és oligo (dT) primerek kombinációjával, amelyek optimális érzékenységet és pontosságot képesek biztosítani az első szál cDNS szintéziséhez. Az azonos típusú reverz transzkriptáz enzim és primer kötődés ellenére a vizsgált cDNS szintetizáló termékek jelentős eltéréseket mutattak hatékonyságban, dinamikus tartományban és a detektálási határérték vonatkozásában. A legkisebb mennyiségű totál RNS mintából (256 pg) az iScript™ cDNS Synthesis Kit és a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit for RT-qPCR termékek voltak alkalmasak CYP3A4 mRNS kimutatására; azonban az iScript™ cDNS Synthesis Kit hatékonyság és dinamikus tartomány terén elmaradt a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit for RT-qPCR terméktől. A Maxima termék bizonyult a leghatékonyabbnak, és a cél szekvencia reverz transzkripcióját ez a termék volt képes katalizálni a legszélesebb koncentráció tartományában (256 pg – 4 µg). A fő különbség a tanulmányozott cDNS szintézis készletek között az RNáz H aktivitás volt, amely az eredeti RNS templátot hivatott elbontani a cDNS szintézist követően. Az iScript™ cDNS Synthesis Kit és a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit for RT-qPCR termékekben található enzimek számottevő RNáz H aktivitással rendelkeztek; míg a qPCRBIO cDNS Synthesis Kit, a SensiFAST™ cDNS Synthesis Kit, és a FastGene Scriptase Basic cDNA Kit reverz transzkriptáz enzim komponensei gyenge RNáz H aktivitással bírtak. A gyenge RNáz H aktivitás vagy annak hiánya a nagy méretű/hosszúságú cDNS előállításánál előnyt jelent; ugyanakkor viszont hátrányt jelentenek a későbbi kvantitatív PCR mérések

során, mivel az RNS templát kötődhet a cDNS molekulához, blokkolva a specifikus primerek kötődését a cDNS templáthoz [Kuang et al. 2018]. A gyenge RNáz H aktivitású vagy RNáz H aktivitással nem rendelkező termékek használatát követően tehát a qPCR mérés előtt további tisztítási lépésre van szükség, amely növeli a cDNS szintézis idejét és a cDNS kitermelés hatékonyságát. Ezért az a cDNS szintetizáló termék a megfelelő választás a reverz transzkripció reakció kivitelezésére, amely magas RNáz H aktivitással rendelkezik, így a cDNS termék közvetlenül felhasználható a qPCR méréshez. A reverz transzkripció reakcióból megmaradó „háttér” RNS tartalom szintén befolyásolhatja a későbbi qPCR érzékenységét [Levesque-Sergerie et al. 2007]; azonban a CYP expressziót duplex vizsgálatokban a referencia GAPDH expresszióhoz viszonyítva határoztuk meg, így az RNS háttérszennyezés mértéke azonos volt a cél és a referenciagének expresszió vizsgálata során.

Ahhoz tehát, hogy széles koncentráció tartományban is megbízható CYP expressziós eredményeket kapjunk, elengedhetetlen volt az RNS extrakció és a qPCR-t megelőző reverz transzkripció szisztematikus optimalizálása. A TRI-reagent[®] előírások szerinti pontos alkalmazása elegendő mennyiségű és kiváló minőségű RNS-t eredményezett a leukocitákból, a „Maxima First Strand cDNS Synthesis kit for RT-qPCR” által végzett reverz transzkripció hatékonyan állította elő a qPCR méréshez közvetlenül felhasználható cDNS templátot; valamint a különböző CYP-ek és a referencia GAPDH kimutatása duplex PCR-ben javította a génexpresszió mérés megbízhatóságát. A módosított CYP expresszió meghatározás a különböző CYP mRNS szintek széles koncentráció tartományában alkalmazható volt, akár a károsodott veseműködésű betegek, akár az egészséges vesefunkciójú szervdonorok leukocitáiban. Az átlagos CYP expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt a végstádiumú vesebetegeknél, mint az egészséges vesefunkciójú szervdonoroknál. A veseelégtelenségben szenvedő betegeknél kimutatott alacsony CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 mRNS szint a CYP gének transzkripció „alulszabályozásának” közvetlen bizonyítéka, amely a klinikumban is megfigyelt csökkent CYP-mediált gyógyszer-metabolizmus magyarázatául szolgálhat [Gasser et al. 1987, Lea-Henry et al. 2018, Limdi et al. 2010, Lobo et al. 2010, Nolin et al. 2003, Sun et al. 2010, Yeung et al. 2014]. Például a CYP2C9 aktivitás csökkenésének következtében a véralvadásgátló *S*-warfarin „clearance” jelentősen lecsökkent a végstádiumú vesebetegeknél [Dreisbach et al. 2003, Gasser et al. 1987], valamint a

közepesen súlyos és súlyos vesebetegségben szenvedő betegek warfarin dóziséigénye szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az egészséges veseműködésű betegeké [Gasser et al. 1987]. A vesekárosodás által kiváltott csökkent CYP2C9 expresszió hatása az antihiperglikémiás tolbutamid „clearance”-re nem igazán értékelhető, mivel a tolbutamid szinte kizárólag renális úton ürül, ezért használata súlyos veseelégtelenségben szenvedő betegeknél kontraindikált [Arnouts et al. 2014]. Patkányokban is megfigyelték a *CYP2C11* (ami a humán *CYP2C9* gén ortológja) expresszió csökkenését krónikus vesebetegség esetén, azonban a máj tolbutamid 4-hidroxilációjában nem detektáltak változást, valószínűleg azért, mert a tolbutamid a humán CYP2C9 ortológgal ellentétben nem szelektív szubsztrátja CYP2C11-nek, patkányokban más CYP enzimek is részt vesznek a tolbutamid metabolizmusában [Velenosi et al. 2012]. A krónikus vesebetegség a *CYP3A2* (ami a humán *CYP3A4* gén ortológja) expresszióját és aktivitását is (eritromicin *N*-demetiláció; midazolám 1'- és 4-hidroxilézis) jelentősen csökkentette patkányokban [Leblond et al. 2001, Velenosi et al. 2012]. A végstádiumú vesebetegeknél a CYP3A4 által katalizált eritromicin *N*-demetiláció sebességének csökkenéséről is beszámoltak; azonban az eritromicin „clearance” megváltozása nem jelent feltétlenül csökkent CYP3A4 aktivitást. Az eritromicin eliminációjában ugyanis fontos tényező még a transzporterek működése (OATP, P-gp), a transzporterek expressziója pedig szintén megváltozhat vesebetegség hatására [Limdi et al. 2010]. Krónikus vesekárosodásban szenvedő betegeknél számos más CYP3A4-szubsztrát, például tadalafil és szolifenacin fokozott szisztémás expozícióját igazolták [Zhang et al. 2009]. Ezzel szemben a CYP3A4 próba szubsztrát midazolám „clearance” változatlanak bizonyult a vesebeteg populációban [Nolin et al. 2009]. A máj CYP1A2 expresszióját illetően a krónikus vesebetegség komplex hatása körvonalazódik: (1.) a humán urémiás szérum jelentősen csökkentette a CYP1A2 expresszióját és aktivitását patkány hepatocitákban [Michaud et al. 2005]; (2.) patkányokban *in vivo* vesekárosodás esetében azonban nem figyeltek meg jelentős mértékű hatást a CYP1A2 expresszióra [Leblond et al. 2001, Velenosi et al. 2014]; (3.) krónikus vesebetegségben szenvedő betegeknél nem találtak, vagy csak enyhe változást észleltek a CYP1A2 szubsztrátok, például duloxetin, lidokain vagy a tasimelteon „clearance”-ében [Tan et al. 2018].

Az általunk végzett vizsgálatban az alacsony CYP expressziót mutató betegek aránya lényegesen magasabbnak bizonyult a végstádiumú vesebetegeknél, mint a szervdonorok

között. A szervdonorok körülbelül egynegyede a magas CYP expressziós kategóriába tartozott; míg a károsodott vesefunkciójú betegeknél magas CYP expressziót alig azonosítottunk. A csökkent gyógyszer-metabolizáló képesség következményeként, egyes gyógyszerek expozíciója megváltozhat, mely jelenség növelheti a túladagolás kockázatát; ezért a krónikus vesebetegeknél javasolható a dozírozás módosítása a mellékhatások elkerülése érdekében [Lea-Henry et al. 2018, Roberts et al. 2018]. A nem renális úton eliminálódó gyógyszerek esetén, mint például a duloxetin, az eritromicin, a ciprofloxacín vagy a warfarin, „clearance” csökkenést figyeltek meg súlyos krónikus vesebetegeknél, a megfigyelések alapján szükség volt az adott gyógyszerek adagolásának csökkentése [Gasser et al. 1987, Limdi et al. 2010, Lobo et al. 2010, Sun et al. 2010]. Fontos kihangsúlyozni, hogy a vesepótló terápia szintén plusz tényezőként komplikálhatja a vesebetegek terápiáját. A veseátültetés lényegesen és stabilan javítja, helyreállíthatja a CYP expressziót és a gyógyszer-metabolizáló képességet; a különböző dialízis kezelések azonban csak átmenetileg fokozhatják a CYP-mediált gyógyszer metabolizmust; a javulás időtartama és mértéke azonban nehezen számszerűsíthető [Momper et al. 2010, Roberts et al. 2018].

Az általunk végzett kutatás eredményeit természetesen a vizsgálat korlátainak tükrében kell értelmezni. A végstádiumú vesebetegek CYP expressziójának összehasonlításához az egészséges kontroll csoportba elhunyt szervdonorok és nem pedig egészséges önkéntesek lettek bevonva. A szervdonorok normális máj és vesefunkciós paramétereit alapján tekintettük a donorokat egészséges vesefunkcióval rendelkezőnek. A megfelelőbb összehasonlítás érdekében további vizsgálatokra lehet szükség bizonyítottan egészséges veseparaméterekkel rendelkező alanyok bevonásával.

6.2 A CYP3A-státusz hatása a takrolimusz vérkoncentrációra, valamint a dózisényre szívtranszplantált betegeknél

A takrolimuszt szűk terápiás koncentráció-tartomány és jelentős inter- és intraindividuális farmakokinetikai variabilitás jellemzi, amely szükségessé teszi a terápiás gyógyszer szint monitorozást az optimális terápia érdekében. Ezért a betegek takrolimusz-metabolizáló képességére vonatkozó információk nagyban hozzájárulhatnak az immunszuppresszív terápia javításához. A CYP3A5 enzim takrolimusz metabolizmusában betöltött meghatározó szerepe jól ismert, számos tanulmány vizsgálta a CYP3A5 genotípus és a

takrolimusz farmakokinetikája közötti összefüggést transzplantált betegekben. A tanulmányok szerint a legalább egy *CYP3A5*1* alléllal rendelkező *CYP3A5*-expresszálók magasabb takrolimusz dózist igényelnek a terápiás vérkoncentráció eléréséhez, mint a *CYP3A5* enzimet nem expresszáló vesetranszplantált betegek, vagy olyan májtranszplantált betegek, akiknél a beültetett máj graft *CYP3A5* enzimet nem expresszált [Kurzawski et al. 2014, Monostory et al. 2015, Pallet et al. 2015, Provenzani et al. 2011]. A *CYP3A5* enzimet nem expresszáló betegekben (akik *CYP3A5*3/*3* genotípussal rendelkeznek) a takrolimusz metabolizmusának fő katalizátora a *CYP3A4*. A *CYP3A4* génnek rengeteg variánsát írták már le; azonban az allélok klinikai relevanciája esetenként ellentmondásos. Amirimani és munkatársai összefüggést mutattak ki a *CYP3A4*1B* allél fokozott *CYP3A4* transzkripciós aktivitásával, azonban a takrolimusz farmakokinetikájára gyakorolt hatása nem teljesen egyértelmű, valószínűleg a *CYP3A4*1B* allélra jellemző mutáció és a *CYP3A5*1* allél genetikai kapcsoltsága miatt, amely elfedi a *CYP3A4*1B* allél hatását a takrolimusz-metabolizmusra [Amirimani et al. 2003, Gervasini et al. 2012, Hesselink et al. 2003, Wang et al. 2011]. Annak ellenére, hogy egyes tanulmányok alapján úgy tűnik, a *CYP3A4*22* allél csökkent enzimaktivitást eredményez, ezzel pedig befolyásolja a takrolimusz „clearance”-t [Elens et al. 2011, Provenzani et al. 2011], a *CYP3A4* gén genetikai variánsaival összességében aligha magyarázhatók a *CYP3A4* expresszióban és a takrolimusz farmakokinetikájában mutatkozó jelentős interindividuais különbségek. Szívátültetett betegeken végzett vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a *CYP3A4* genotípus (a *CYP3A4*1B* és a *CYP3A4*22* allélok) és a *CYP3A4* mRNS expresszió között. Azt feltételeztük, hogy a nem-genetikai tényezők következtében fellépő fenokonverzió elfedte a *CYP3A4* genetikai variánsok expressziót befolyásoló hatását. A szívátültetett betegek posztoperatív *CYP3A4* mRNS expressziója szignifikánsan eltért az egészséges populáció expressziójától. Az alacsony, átlagos és magas *CYP3A4* expressziót mutató betegek aránya jelentősen különbözött az egészséges májfunkcióval rendelkező májdonorok csoportjában tapasztalt *CYP3A4* expressziótól [szívátültetett betegek (N=232): 56%, 43,1%, 0,9% vs. májdonorok (N=112): 40,2%, 47,3%12,5%; $\text{Khi}^2 = 26,031$; $P < 0,0001$] [Csikány et al. 2021]. Feltételezhetően olyan nem-genetikai tényezők, mint a primer szívbetegség vagy a primer betegség következményei, valamint a műtéti stressz eltolták a *CYP3A4* expresszióját az alacsony *CYP3A4* mRNS-szintek

felé. Krónikus szívelégtelenségben szenvedő betegeknél a máj gyógyszer-metabolizáló képességének csökkenését több különböző faktor eredőjének tulajdonítják [Zordoky & El-Kadi 2008]. Bár a pontos mechanizmusok még nem tisztázottak, feltételezik, hogy a gyenge szívműködés következtében a máj megnövekedett vénás nyomása és a csökkent artériás oxigéntelítettség (hypoxia) gyulladással citokinek, például IL-2 (interleukin-2), IL-4, IL-6 és IFN- γ (interferon γ) termelődését idézi elő. Továbbá a sebészeti beavatkozás során fellépő ischaemia gyulladással citokinek, a TNF- α és az IL-6 felszabadulásával jár együtt annak ellenére, hogy a transzplantáció idején nagy dózisu kortikoszteroid-kezelést alkalmaznak [Wan et al. 1996]. Ezen citokinekről kimutatták, hogy csökkentik a CYP3A4 és a CYP3A5 expresszióját és működését mind a hepatocitákban, mind a pedig bélfal sejtjeiben [Abdel-Razzak et al. 1993, Aitken & Morgan 2007, Dickmann et al. 2011, Enokiya et al. 2021, Mimura et al. 2015, Simon et al. 2019]. Vesetranszplantált betegeknél a takrolimusz „clearance” átmeneti csökkenését figyelték meg 3-4 nappal a transzplantáció után, amit a szérum IL-6 koncentráció átmeneti növekedésének tulajdonítanak [Enokiya et al. 2021]. Habár proinflammatorikus citokin szinteket nem határoztunk meg a vizsgált szívtültetett beteg populációban, logikus feltételezés, hogy az IL-6 vagy TNF- α koncentráció megemelkedett a sebészeti beavatkozás következtében. A szívtranszplantált betegeknél szignifikáns összefüggést találtunk a műtét utáni takrolimusz vérkoncentráció (C_0/D) és a betegek CYP3A-státusza között (CYP3A5 genotípus és CYP3A4 expresszió) között. Az *in vitro* és klinikai eredményekkel összhangban, miszerint a CYP3A5*1 allélt hordozó személyek extenzív takrolimusz-metabolizáló képességgel bírnak [Dai et al. 2006, Diaz-Molina et al. 2012, Gijssen et al. 2011, Kniepeiss et al. 2011], a legalacsonyabb takrolimusz C_0/D vérkoncentráció értékek olyan betegeknél volt megfigyelhetőek, akik legalább egy CYP3A5*1 alléllal rendelkeztek, következésképpen működő CYP3A5 enzimet expresszáltak. A CYP3A5 enzimhiányos betegek között a normalizált vérkoncentráció megközelítőleg kétszer magasabb volt azoknál a betegeknél, akik átlagos szinten expresszálták a CYP3A4-et és közel négyszer magasabb volt azoknál a betegeknél, akik alacsony CYP3A4 expressziót mutattak, a CYP3A5 expresszázó betegek vérszintjéhez képest. A korai posztoperatív időszakban a kezdeti 10-15 ng/ml takrolimusz célkoncentráció eléréséhez szükséges átlagos napi dózis jelentősen magasabb volt a CYP3A5-t expresszázó betegeknél, mint a CYP3A5 enzimmel nem rendelkezőknél; továbbá jelentős különbségeket figyeltünk meg

az alacsony és átlagos CYP3A4 mRNS expressziót mutató (*CYP3A4**3/*3 genotípussal rendelkező) betegek dóziséigénye között is. A klasszikus klinikai protokoll szerint a takrolimusz kezdeti dózisa 0,1 mg/testtömeg-kg [Kim et al. 2018, Kobashigawa & Luu 2017]. A terápiás vérkoncentráció eléréséhez szükséges dozírozás az általunk megállapított CYP3A-státusz függvényében némi módosítást igényel. A *CYP3A5**1 allélt hordozó CYP3A5 expresszáló esetében a kezdeti dózis lényeges növelésére (140% dózis növelés) volt szükség, míg a *CYP3A5**3/*3 genotípussal rendelkező alacsony és átlagos CYP3A4 expressziót mutató recipienseknél kisebb módosításokra volt csak szükség (20%-os dózis csökkentés és 40%-os dózis növelés). A *CYP3A5* genotípus-függő dóziséigényre vonatkozó eredményeink egybevágóak a nemzetközi szakirodalmi adatokkal, miszerint a szívtültetésen átesett betegek napi takrolimusz dózisének jelentős növelésére van szükség a *CYP3A5**1 allélt hordozó betegek esetében [Deininger et al. 2016, Diaz-Molina et al. 2012, Gijssen et al. 2011, Uno et al. 2018]. Gyermekek szívttranszplantáció esetén a CYP3A5 enzimet expresszáló recipienseknek hasonló dóziséigénye volt, mint az általunk vizsgált felnőtt szívtültetett populációban (gyermek: 0,278 és felnőtt: 0,240 mg/testtömeg-kg) [Gijssen et al. 2011]. Egyes szerzők a *CYP3A5* genotípus mellett, mint szintén öröklődő tényezőt a csökkent enzimaktivitással társított *CYP3A4**22 allélt is javasolják beépíteni a személyre szabott takrolimusz-terápiát segítő farmakogenetikai elemzésbe [Elens et al. 2013]. Egy másik álláspont szerint azonban a szívtültetett betegeknél a *CYP3A4**22 allél azonosítása akár önmagában, akár a *CYP3A5* genotípussal kombinálva nem nyújt többlet hasznot, mint amennyit a *CYP3A5* genotípus megállapítása jelent [Deininger et al. 2016, Gijssen et al. 2013]. Ezekben a vizsgálatokban azonban CYP3A4 expresszióját nem mérték, a takrolimusz-metabolizáló képességről nem álltak rendelkezésre információk a CYP3A5 enzimhiányos recipienseknél, azaz a betegek többségénél. Egy korábbi, májtranszplantált betegek bevonásával végzett vizsgálat kimutatta, hogy a donorok CYP3A-státusza (*CYP3A5* genotípus és CYP3A4 expresszió) összefüggésben áll a recipiensek takrolimusz „clearance”-ével [Monostory et al. 2015]. A takrolimusz adagolását azonban csak azoknál a recipienseknél kellett módosítani, akiknél a beültetett graft funkcionális *CYP3A5**1 allélt hordozott, vagy CYP3A5 enzimhiányos, alacsony vagy magas CYP3A4 expressziót mutató donormájat kaptak (a májtranszplantált betegek körülbelül 60%-a). Azok számára, akik átlagos CYP3A4 expressziót mutató grafttal rendelkeztek, az ajánlott napi 0,1 mg/testtömeg kg

takrolimusz dózis megfelelő volt a terápiás vérkoncentráció beállításához. Ezzel szemben a szívtranszplantált betegek terápiájának vizsgálatából az látszik, hogy a kezdeti dózis módosítása bizonyos mértékig szükséges volt minden szívatültetett beteg esetében.

Számos fenokonverziót előidéző tényező (primer betegség, sebészeti beavatkozás, gyógyszeres kezelés) jelentősen módosíthatja a *CYP3A* gének expresszióját és a betegek takrolimusz-metabolizáló kapacitását a transzplantációt követő korai és a késői posztoperatív időszakban. A longitudinális utánkövetéses vizsgálatban a szívatültetést követő első hónapban a *CYP3A4* mRNS expresszió jelentős növekedését figyeltük meg. A perioperatív időszakban a viszonylag alacsony *CYP3A4* expresszió elsődlegesen a kóros állapotnak és a műtéti stressznek volt tulajdonítható, a későbbiekben ez az állapot részben a kortikoszteroid kezelés következtében javult. A metilprednizolon nagy kezdő dózisa (250-125 mg/nap), majd a műtétet követő 3. héten a napi 8 mg dózis feltehetőleg indukálta a *CYP3A4* gén transzkripcióját. A *CYP3A4* mRNS expresszió folyamatos növekedési tendenciáját figyeltük meg a transzplantációt követő 6 hónapig, amely a műtétet követő első év végéig, lényegében a kortikoszteroid terápia visszavonásáig változatlanul magas szintű maradt. A kortikoszteroid kezelés elhagyást követően a *CYP3A4* expresszió csökkenni kezdett. Ezzel párhuzamosan a maximális takrolimusz-metabolizáló kapacitás már a műtétet követő első hónap után helyreállt, míg a kortikoszteroid megvonás csökkentette a takrolimusz „clearance”-ét a *CYP3A5* enzimmel nem rendelkező betegeknél. Azoknál a betegeknél, akik hordozták a *CYP3A5*1* allélt, a kortikoszteroid dózis csökkentése és visszavonása azonban nem változtatta meg a takrolimusz-metabolizáló kapacitást. Vesetranszplantált betegek bevonásával készült tanulmány is beszámolt a kortikoszteroidok és a takrolimusz közti farmakokinetikai interakcióról, melyet a szerzők a *CYP3A* enzimek és az efflux transzporter P-gp indukciójának tulajdonítottak [Anglicheau et al. 2003]. A kortikoszteroid dózis csökkentését és megvonását követően jelentős növekedést mutattak ki a takrolimusz dózissal korrigált expozíciójában a *CYP3A5* enzimmel nem rendelkező vesetranszplantált betegeknél [de Jonge et al. 2015, Stiff et al. 2018, van Duijnhoven et al. 2003]. Azonban nem találtak, vagy csak elhanyagolható mértékű emelkedést figyeltek meg a takrolimusz vérkoncentrációban (C_0/D) a *CYP3A5*1* hordozóknál, ami összhangban van az általunk vizsgált szívatültetett populációban nyert eredményekkel.

A kortikoszteroidok, például a metilprednizolon és a prednizolon a CYP3A4 transzkripció induktorának bizonyult, a CYP3A5 expresszióját azonban nem fokozták [Matsunaga et al. 2012], igazolva a kortikoszteroid hatásban mutatózó különbségeket a CYP3A5 enzimmel rendelkezők és az enzimhiányos páciensek között.

A szívtranszplantált betegek bevonásával végzett vizsgálat korlátait tekintve, fontos megállapítani, hogy a betegeknél a *CYP3A5*3*, a *CYP3A4*1B* és a *CYP3A4*22* allélok kivül nem vizsgáltunk további *CYP3A5* és *CYP3A4* allélokat. Igaz, hogy a kaukázusi populációban egyéb, klinikailag releváns *CYP3A* allél előfordulási gyakorisága rendkívül alacsony [Zhou et al. 2017]. Az eredmények értelmezése során a szteroid terápia részletein túl néhány lehetséges lényeges tényezőt, például az életkort és a hematokrit értéket sem vettük figyelembe. A *CYP3A5* expressziója és aktivitása a korai gyermekkortól egészen a felnőttkorig állandó, míg a *CYP3A4* expressziója 3 éves korban már meghaladja a felnőtt szintet, majd pubertáskorban visszaesik a felnőtt szintre, idős korban pedig ismét egy markáns csökkenés figyelhető meg [de Wildt et al. 2014, Staatz & Tett 2004, Tanaka 1998]. Az általunk tanulmányozott szívtranszplantált csoport betegei mind 18 év feletti voltak, és a 232 vizsgálatba vont páciensből csak 8 beteg volt 65 évnél idősebb a transzplantáció idején, ezért a betegek életkorát mérsékelt vagy elhanyagolható jelentőségű fenokonverziós tényezőnek tekintettük. A takrolimusz erősen kötődik a vörösvértestekhez; ezért a korai posztoperatív időszak hematokrit változása befolyásolhatja a takrolimusz „clearance” értékét [Staatz & Tett 2004]. Bár a dózissal korrigált takrolimusz vérkoncentráció némi csökkenése volt észlelhető a transzplantációt követő első hónap folyamán, ez inkább talán a *CYP3A4* expresszió növekedésének tudható be, mintsem a hematokrit változásának.

6.3 Májtranszplantált recipiensek és a donorok *CYP3A5* genotípus meghatározásának klinikai jelentősége

Számos klinikai vizsgálat értékelte a gasztrointesztinális traktus *CYP3A5* polimorfizmusainak (recipiens *CYP3A5* genotípus) hatását a takrolimusz farmakokinetikájára. Több, főleg élő donoros májtranszplantáción átesett beteg bevonásával végzett vizsgálat kimutatta, hogy a recipiensek *CYP3A5* genotípusának fontos szerepe lehet a takrolimusz vérkoncentráció és a dózisingény kialakításában a műtétet követő első hónapban [Fukudo et al. 2008, Itohara et al. 2019, Ji et al. 2012,

Uesugi et al. 2006], míg más tanulmányok a donor (máj) *CYP3A5* polimorfizmusok takrolimusz metabolizmusra gyakorolt hatását hangsúlyozták a recipiens (bél) *CYP3A5* genotípusával szemben [Li et al. 2007, Provenzani et al. 2011, Wei-lin et al. 2006]. Kínai betegek bevonásával végzett multicentrikus vizsgálat eredményei szerint a takrolimusz kezelés első hetétől kezdve a műtétet követő év során legalább akkora szerepe van a graft *CYP3A5* genotípusának a vérszint kialakításában, mint a recipiens saját (bél) *CYP3A5* genotípusának. Az adatok szerint a posztoperatív időszak 3. hónapjáig, a két metabolizáló szerv (bél és máj) egyformán hozzájárul a takrolimusz vérszint kialakításához, ezt követően pedig a beültetett máj szerepe válik hangsúlyossá [Liu et al. 2020, Liu et al. 2018]. 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. Az eredményeink értelmezéséhez mindenképpen fontos figyelembe venni, hogy donor/recipiens *CYP3A5* genotípus kombinációs csoportok elemszáma meglehetősen heterogén, a *CYP3A5*-t expresszáló recipiensek alkotta csoportok elemszáma igen alacsony, mely befolyásolhatja az eredmények robusztusságát, megbízhatóságát. Az mindenképpen látszik eredményeinkből, hogy a donor *CYP3A5* genotípusa szignifikáns hatással van a takrolimusz farmakokinetikai paramétereire, azonban a recipiens *CYP3A5* genotípus fontosságának megerősítő vizsgálatához az alacsony számú transzplantált beteget tartalmazó csoportok elemszám növelésére, újabb betegek vizsgálatba való bevonására van szükség.

Ahogy a vérkoncentrációval való összevetés során, úgy a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózis és a donor/recipiens *CYP3A5* genotípus viszonya is némileg ellentmondásos a szakirodalomban. Egyes szerzők arra a konklúzióra jutottak, hogy a megfelelő takrolimusz dózis beállításában ugyanakkora szerepe van a recipiens *CYP3A5* genotípusának, mint a beültetett graft *CYP3A5* polimorfizmusnak [Li et al. 2007, Shao et al. 2020]. A májátültetés utáni első hónap takrolimusz farmakokinetikai viselkedésének metaanalíziséből azt a következtetést vonták le, hogy a donor *CYP3A5* genotípusa legalább akkor jelentőséggel bír a takrolimusz farmakokinetikai paramétereire, mint a recipiens genotípusa [Naushad et al. 2019].

Fukudo és munkatársai, a recipiens *CYP3A5* genotípus fontosságát írták le a takrolimusz dóziséigényével kapcsolatban a korai posztoperatív időszakban (7. és 14. nap), azonban azt is kimutatták, hogy a recipiens enterocitáinak *CYP3A5* genotípusa egy hónappal a műtét után már szignifikánsan nem befolyásolja a takrolimusz dóziséigényt [Fukudo et al. 2008]. A modern összefoglaló tanulmányok többsége is az előbb említett vizsgálattal összhangban, időfüggő változással jellemzi a *CYP3A5* genotípus fontosságát a takrolimusz farmakokinetikai paramétereire vonatkozóan. Az első néhány hétben jelentősebb szerepe van a recipiens genotípusnak a donor máj *CYP3A5* genotípusával szemben, amely kontribúciós arány a későbbi időszakban megfordul [Brunet et al. 2019, Kuypers 2018]. Saját mérési eredményeink alapján, a vérszintet befolyásoló hatáshoz hasonlóan arra az eredményre jutottunk, hogy a donor *CYP3A5* genotípusának domináns szerepe van a megfelelő dózis megválasztásában, magasabb testtömeeggel normalizált dózis szükséges a kívánt vérszint eléréséhez akkor, ha a donornak van *CYP3A5* expressziója a recipiens genotípusától függetlenül. Adataink értelmezését alátámasztják az elhunyt donoros májtranszplantációs tanulmányokban publikált eredmények, melyek szerint a vizsgált májfunkciós paraméterek egy része már 1-2 hét után, de egy hónappal a műtét után már minden paraméter visszaállt a normális szintre [Chen et al. 2020, Naik et al. 2013]. Élődonoros májtranszplantációs vizsgálatok is hasonló eredményekről számoltak be, ott ugyanis már egy héttel a szervátültetés után jelentős májfunkció és májtömeg béli javulás, egy hónappal a műtét után pedig lényegében teljes regeneráció figyelhető meg a beültetett graft esetében [Itohara et al. 2019, Taki-Eldin et al. 2012]. Az általunk vizsgált takrolimusz dózis adatok, habár a korai posztoperatív időszakból származnak, már stabil terápiás vérkoncentrációval rendelkező betegek gyógyszereléséből származnak, a beültetett máj működése ugyanis normalizálódott, gyógyszer-metabolizáló funkcióját ellátja. A graft regeneráció, működésbeli javulás és szervtömeg növekedés a kezdeti ischaemiás károsodás normalizálódásának és a reperfüzió helyreállításának köszönhető [Buendia et al. 2015].

7 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 köszönhetők, 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 dózisének (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 dózisének, 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 dózissal való hatását külön is vizsgáltuk. A vérszintet befolyásoló hatáshoz hasonlóan, a dózissal való 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.

8 Összefoglalás

A humán gyógyszer-metabolizmus inter- és intra-individuális variabilitása sokszor a jelentős genetikai polimorfizmusra vezethető vissza, az eltérések mögött azonban külső (gyógyszeres kezelés, alkoholfogyasztás, dohányzás), és belső tényezők is (nem, életkor, hormonális állapot, betegségek) állhatnak. A CYPtest™ diagnosztikai rendszer a *CYP* gének releváns polimorfizmusainak integratív elemzésén és mRNA-expresszió mérésén alapul, használatával becsülhető a betegek gyógyszer-metabolizáló képessége. Egyes klinikai minták alacsony CYP mRNA expresszió szintjei és a korlátozottan hozzáférhető biológiai minták miatt szükséges volt a módszer optimalizálása. A metodikai optimalizációt követően megvizsgáltuk 4 fontos gyógyszer-metabolizáló CYP enzim (*CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4*) mRNA expresszióját végstádiumú vesebetegeknél, valamint egészséges vesefunkcióval rendelkező szervdonoroknál. Megállapítottuk, hogy minden vizsgált CYP mRNA-szintje vesebetegeknél szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a szervdonorokban megfigyelt expressziós értékekhez képest. Szívtranszplantált betegeknél felmértük a korai posztoperatív *CYP3A*-státusz (*CYP3A5* genotípus és *CYP3A4* mRNA expresszió) és a takrolimusz expozíció kapcsolatát. Összefüggést mutattunk ki a *CYP3A*-státusz és a takrolimusz C_0/D vérszint, valamint a terápiás hatáshoz szükséges dózis között. A szívtranszplantált recipienseknél megállapítottuk, hogy a műtétet követő 15 hónapban az idő függvényében változó kortikoszteroid dozírozás hatással van a *CYP3A4* gén mRNA expressziójára és ebből kifolyólag a *CYP3A4* mediált gyógyszer-metabolizmusra is. Továbbá májtranszplantált betegeknél megállapítottuk, hogy a transzplantációt követő korai posztoperatív időszakban a beültetett graft *CYP3A5* genotípusának szerepe (*CYP3A5*1* allél jelenléte) megerősíthető a takrolimusz vérszint kialakulásában, azonban a bélfal (recipiens) genotípusának (*CYP3A5*1* allél jelenléte) szignifikáns szerepét nem tudtuk igazolni. A gyógyszer-metabolizáló kapacitáshoz igazított személyre szabott terápia a megfelelő gyógyszer-dózis választással hozzájárulhat a kevesebb mellékhatással és jobb graft/beteg túléléssel járó terápiához.

9 Summary

Inter- and intra-individual variability in human drug metabolism is primarily attributed to genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes; however, external (medication, alcohol consumption, smoking) and internal factors (gender, age, hormonal status, disease) can also contribute to the variability. CYPtest™ diagnostic system for the estimation of patients' drug-metabolizing capacity is based on integrative analysis of relevant polymorphisms and mRNA expression of *CYP* genes. Because of the low levels of CYP mRNA expression in some clinical samples and the limited availability of biological samples, it was necessary to optimize the method. Following methodological optimization, we investigated mRNA expression of 4 important drug-metabolizing CYP enzymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4) in patients with end-stage renal disease and in organ donors with healthy renal function. In patients with impaired renal function, CYP mRNA levels were significantly lower than in organ donors. In heart transplant patients, the relationship between early postoperative CYP3A status (*CYP3A5* genotype and CYP3A4 mRNA expression) and tacrolimus exposure was also assessed. Recipients' CYP3A status was associated with tacrolimus C₀/D blood levels and dose requirement for therapeutic blood concentration. In cardiac transplant recipients, corticosteroid therapy with continuously reduced dosing in the 15-month period after surgery was found to affect CYP3A4 mRNA expression and consequently CYP3A4-mediated drug metabolism. Furthermore, in liver transplant patients, the role of the liver graft *CYP3A5* genotype (the presence of *CYP3A5*1* allele) in tacrolimus blood levels was confirmed in the early postoperative period, while a significant role of intestinal genotype (the presence of *CYP3A5*1* allele) was not observed. Personalized therapy with appropriate dosing adjusted to the patients' drug-metabolizing capacity can contribute to the reduction of adverse reactions and to the improvement of graft/patient survival.

10 Irodalomjegyzék

1. — Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., Guillouzo, A. (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*, 44, 707-715.
2. — Achour, B., Barber, J., Rostami-Hodjegan, A. (2014) Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes and their intercorrelations: a meta-analysis. *Drug Metab Dispos*, 42, 1349-1356.
3. — Aitken, A.E., Morgan, E.T. (2007) Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 35, 1687-1693.
4. — Albring, A., Wendt, L., Harz, N., Engler, H., Wilde, B., Kribben, A., Lindemann, M., Schedlowski, M., Witzke, O. (2015) Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Clin Transplant*, 29, 294-300.
5. — Ali, N., Rampazzo, R.C.P., Costa, A.D.T., Krieger, M.A. (2017) Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int*, 2017, 9306564.
6. — Almazroo, O.A., Miah, M.K., Venkataramanan, R. (2017) Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis*, 21, 1-20.
7. — Amirimani, B., Ning, B., Deitz, A.C., Weber, B.L., Kadlubar, F.F., Rebbeck, T.R. (2003) Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen*, 42, 299-305.
8. — Anglicheau, D., Verstuyft, C., Laurent-Puig, P., Becquemont, L., Schlageter, M.H., Cassinat, B., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. (2003) Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*, 14, 1889-1896.
9. — Arnouts, P., Bolignano, D., Nistor, I., Bilo, H., Gnudi, L., Heaf, J., van Biesen, W. (2014) Glucose-lowering drugs in patients with chronic kidney disease: a

- narrative review on pharmacokinetic properties. *Nephrol Dial Transplant*, 29, 1284-1300.
10. — Bains, R.K. (2013) African variation at Cytochrome P450 genes: Evolutionary aspects and the implications for the treatment of infectious diseases. *Evol Med Public Health*, 2013, 118-134.
 11. — Bains, R.K., Kovacevic, M., Plaster, C.A., Tarekegn, A., Bekele, E., Bradman, N.N., Thomas, M.G. (2013) Molecular diversity and population structure at the Cytochrome P450 3A5 gene in Africa. *BMC Genet*, 14, 34.
 12. — Baraldo, M., Gregoraci, G., Livi, U. (2014) Steroid-free and steroid withdrawal protocols in heart transplantation: the review of literature. *Transpl Int*, 27, 515-529.
 13. — Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263-265.
 14. — Baumgart, D.C., Sandborn, W.J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 369, 1641-1657.
 15. — Bienfait, K., Chhibber, A., Marshall, J.C., Armstrong, M., Cox, C., Shaw, P.M., Paulding, C. (2021) Current challenges and opportunities for pharmacogenomics: perspective of the Industry Pharmacogenomics Working Group (I-PWG). *Hum Genet*.
 16. — Bihari L., Piros L., Szabó J., Gerlei Zs., Sandil A., Rózsa B., Mándli T., Fazakas J., Doros A., L., K. (2021) Liver transplantation. *Central European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 7, 43-46.
 17. — Bikbov, B., Purcell, C.A., Levey, A.S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., Adebayo, O.M., Afarideh, M., Agarwal, S.K., Agudelo-Botero, M., Ahmadian, E., Al-Aly, Z., Alipour, V., Almasi-Hashiani, A., Al-Raddadi, R.M., Alvis-Guzman, N., Amini, S., Andrei, T., Andrei, C.L., Andualem, Z., Anjomshoa, M., Arabloo, J., Ashagre, A.F., Asmelash, D., Ataro, Z., Atout, M.M.d.W., Ayanore, M.A., Badawi, A., Bakhtiari, A., Ballew, S.H., Balouchi, A., Banach, M., Barquera, S., Basu, S., Bayih, M.T., Bedi, N., Bello, A.K., Bensenor, I.M., Bijani, A., Bloor, A., Borzì, A.M., Cámara, L.A., Carrero, J.J., Carvalho, F., Castro, F., Catalá-López, F., Chang, A.R., Chin, K.L., Chung, S.-C., Cirillo, M., Cousin, E., Dandona, L., Dandona, R., Daryani, A., Das Gupta, R., Demeke, F.M., Demoz,

G.T., Desta, D.M., Do, H.P., Duncan, B.B., Eftekhari, A., Esteghamati, A., Fatima, S.S., Fernandes, J.C., Fernandes, E., Fischer, F., Freitas, M., Gad, M.M., Gebremeskel, G.G., Gebresillassie, B.M., Geta, B., Ghafourifard, M., Ghajar, A., Ghith, N., Gill, P.S., Ginawi, I.A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Hariyani, N., Hasan, M., Hasankhani, M., Hasanzadeh, A., Hassen, H.Y., Hay, S.I., Heidari, B., Herteliu, C., Hoang, C.L., Hosseini, M., Hostiuc, M., Irvani, S.S.N., Islam, S.M.S., Jafari Balalami, N., James, S.L., Jassal, S.K., Jha, V., Jonas, J.B., Joukar, F., Jozwiak, J.J., Kabir, A., Kahsay, A., Kasaean, A., Kassa, T.D., Kassaye, H.G., Khader, Y.S., Khalilov, R., Khan, E.A., Khan, M.S., Khang, Y.-H., Kisa, A., Kovesdy, C.P., Kuate Defo, B., Kumar, G.A., Larsson, A.O., Lim, L.-L., Lopez, A.D., Lotufo, P.A., Majeed, A., Malekzadeh, R., März, W., Masaka, A., Meheretu, H.A.A., Miazgowski, T., Mirica, A., Mirrahimov, E.M., Mithra, P., Moazen, B., Mohammad, D.K., Mohammadpourhodki, R., Mohammed, S., Mokdad, A.H., Morales, L., Moreno Velasquez, I., Mousavi, S.M., Mukhopadhyay, S., Nachege, J.B., Nadkarni, G.N., Nansseu, J.R., Natarajan, G., Nazari, J., Neal, B., Negoi, R.I., Nguyen, C.T., Nikbakhsh, R., Noubiap, J.J., Nowak, C., Olagunju, A.T., Ortiz, A., Owolabi, M.O., Palladino, R., Pathak, M., Poustchi, H., Prakash, S., Prasad, N., Rafiei, A., Raju, S.B., Ramezanzadeh, K., Rawaf, S., Rawaf, D.L., Rawal, L., Reiner, R.C., Rezapour, A., Ribeiro, D.C., Roeber, L., Rothenbacher, D., Rwegerera, G.M., Saadatagah, S., Safari, S., Sahle, B.W., Salem, H., Sanabria, J., Santos, I.S., Sarveazad, A., Sawhney, M., Schaeffner, E., Schmidt, M.I., Schutte, A.E., Sepanlou, S.G., Shaikh, M.A., Sharafi, Z., Sharif, M., Sharifi, A., Silva, D.A.S., Singh, J.A., Singh, N.P., Sisay, M.M.M., Soheili, A., Sutradhar, I., Teklehaimanot, B.F., Tesfay, B.e., Teshome, G.F., Thakur, J.S., Tonelli, M., Tran, K.B., Tran, B.X., Tran Ngoc, C., Ullah, I., Valdez, P.R., Varughese, S., Vos, T., Vu, L.G., Waheed, Y., Werdecker, A., Wolde, H.F., Wondmieneh, A.B., Wulf Hanson, S., Yamada, T., Yeshaw, Y., Yonemoto, N., Yusefzadeh, H., Zaidi, Z., Zaki, L., Zaman, S.B., Zamora, N., Zarghi, A., Zewdie, K.A., Ärnlöv, J., Coresh, J., Perico, N., Remuzzi, G., Murray, C.J.L., Vos, T. (2020) Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 395, 709-733.

18. — Birdwell, K.A., Decker, B., Barbarino, J.M., Peterson, J.F., Stein, C.M., Sadee, W., Wang, D., Vinks, A.A., He, Y., Swen, J.J., Leeder, J.S., van Schaik, R., Thummel, K.E., Klein, T.E., Caudle, K.E., MacPhee, I.A. (2015) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 98, 19-24.
19. — Birdwell, K.A., Grady, B., Choi, L., Xu, H., Bian, A., Denny, J.C., Jiang, M., Vranic, G., Basford, M., Cowan, J.D., Richardson, D.M., Robinson, M.P., Ikizler, T.A., Ritchie, M.D., Stein, C.M., Haas, D.W. (2012) The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*, 22, 32-42.
20. — Black, C.K., Termanini, K.M., Aguirre, O., Hawksworth, J.S., Sosin, M. (2018) Solid organ transplantation in the 21(st) century. *Ann Transl Med*, 6, 409.
21. — Borrelli, F., Izzo, A.A. (2009) Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *AAPS J*, 11, 710-727.
22. — Bruckmueller, H., Werk, A.N., Renders, L., Feldkamp, T., Tepel, M., Borst, C., Caliebe, A., Kunzendorf, U., Cascorbi, I. (2015) Which Genetic Determinants Should be Considered for Tacrolimus Dose Optimization in Kidney Transplantation? A Combined Analysis of Genes Affecting the CYP3A Locus. *Ther Drug Monit*, 37, 288-295.
23. — Brunet, M., van Gelder, T., Asberg, A., Haufroid, V., Hesselink, D.A., Langman, L., Lemaitre, F., Marquet, P., Seger, C., Shipkova, M., Vinks, A., Wallemacq, P., Wieland, E., Woillard, J.B., Barten, M.J., Budde, K., Colom, H., Dieterlen, M.T., Elens, L., Johnson-Davis, K.L., Kunicki, P.K., MacPhee, I., Masuda, S., Mathew, B.S., Millan, O., Mizuno, T., Moes, D.A.R., Monchaud, C., Noceti, O., Pawinski, T., Picard, N., van Schaik, R., Sommerer, C., Vethe, N.T., de Winter, B., Christians, U., Bergan, S. (2019) Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus- Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther Drug Monit*, 41, 261-307.
24. — Buendia, J.A., Otamendi, E., Kravetz, M.C., Cairo, F., Ruf, A., de Davila, M., Powazniak, Y., Nafissi, J., Lazarowski, A., Bramuglia, G., Villamil, F. (2015)

- Combinational Effect of CYP3A5 and MDR-1 Polymorphisms on Tacrolimus Pharmacokinetics in Liver Transplant Patients. *Exp Clin Transplant*, 13, 441-448.
25. — Charlton, M., Levitsky, J., Aqel, B., O'Grady, J., Hemibach, J., Rinella, M., Fung, J., Ghabril, M., Thomason, R., Burra, P., Little, E.C., Berenguer, M., Shaked, A., Trotter, J., Roberts, J., Rodriguez-Davalos, M., Rela, M., Pomfret, E., Heyrend, C., Gallegos-Orozco, J., Saliba, F. (2018) International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Immunosuppression in Liver Transplant Recipients. *Transplantation*, 102, 727-743.
26. — Chen, L., Shi, X., Lv, G., Sun, X., Sun, C., Cai, Y., Niu, J., Jin, J., Liu, N., Li, W. (2020) The long-term outcomes of deceased-donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis: a two-center study in China. *PeerJ*, 8, e9563.
27. — Chomczynski, P., Wilfinger, W., Kennedy, A., Rymaszewski, M., Mackey, K. (2013) RNAzol® BD: a reagent for the effective isolation of RNA from whole blood. *Nature Methods*, 10, ii-ii.
28. — 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.
29. — Dai, Y., Hebert, M.F., Isoherranen, N., Davis, C.L., Marsh, C., Shen, D.D., Thummel, K.E. (2006) Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*, 34, 836-847.
30. — Dally, H., Bartsch, H., Jager, B., Edler, L., Schmezer, P., Spiegelhalder, B., Dienemann, H., Drings, P., Kayser, K., Schulz, V., Risch, A. (2004) Genotype relationships in the CYP3A locus in Caucasians. *Cancer Lett*, 207, 95-99.
31. — Dandel, M., Lehmkuhl, H.B., Knosalla, C., Hetzer, R. (2010) Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. *Transpl Immunol*, 23, 93-103.
32. — de Jonge, H., Vanhove, T., de Loor, H., Verbeke, K., Kuypers, D.R. (2015) Progressive decline in tacrolimus clearance after renal transplantation is partially explained by decreasing CYP3A4 activity and increasing haematocrit. *Br J Clin Pharmacol*, 80, 548-559.

33. — de Wildt, S.N., Tibboel, D., Leeder, J.S. (2014) Drug metabolism for the paediatrician. *Arch Dis Child*, 99, 1137-1142.
34. — Deininger, K.M., Vu, A., Page, R.L., 2nd, Ambardekar, A.V., Lindenfeld, J., Aquilante, C.L. (2016) CYP3A pharmacogenetics and tacrolimus disposition in adult heart transplant recipients. *Clin Transplant*, 30, 1074-1081.
35. — Denton, M.D., Magee, C.C., Sayegh, M.H. (1999) Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet*, 353, 1083-1091.
36. — Deodhar, M., Al Rihani, S.B., Arwood, M.J., Darakjian, L., Dow, P., Turgeon, J., Michaud, V. (2020) Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice. *Pharmaceutics*, 12.
37. — Déri, M., Szakál-Tóth, Z., 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*, 11, 21389.
38. — 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.
39. — Diaz-Molina, B., Távira, B., Lambert, J.L., Bernardo, M.J., Alvarez, V., Coto, E. (2012) Effect of CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genotypes as determinants of tacrolimus dose and clinical outcomes after heart transplantation. *Transplant Proc*, 44, 2635-2638.
40. — Dickmann, L.J., Patel, S.K., Rock, D.A., Wienkers, L.C., Slatter, J.G. (2011) Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos*, 39, 1415-1422.
41. — Dickmann, L.J., Patel, S.K., Wienkers, L.C., Slatter, J.G. (2012) Effects of interleukin 1beta (IL-1beta) and IL-1beta/interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Curr Drug Metab*, 13, 930-937.

42. — Döring, B., Petzinger, E. (2014) Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab Rev*, 46, 261-282.
43. — Dreisbach, A.W. (2009) The influence of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther*, 86, 553-556.
44. — Dreisbach, A.W., Japa, S., Gebrekal, A.B., Mowry, S.E., Lertora, J.J., Kamath, B.L., Rettie, A.E. (2003) Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther*, 73, 475-477.
45. — Elens, L., Bouamar, R., Hesselink, D.A., Haufroid, V., van der Heiden, I.P., van Gelder, T., van Schaik, R.H. (2011) A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem*, 57, 1574-1583.
46. — Elens, L., van Gelder, T., Hesselink, D.A., Haufroid, V., van Schaik, R.H. (2013) CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics*, 14, 47-62.
47. — Enokiya, T., Nishikawa, K., Hamada, Y., Ikemura, K., Sugimura, Y., Okuda, M. (2021) Temporary decrease in tacrolimus clearance in cytochrome P450 3A5 non-expressors early after living donor kidney transplantation: Effect of interleukin 6-induced suppression of the cytochrome P450 3A gene. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 128, 525-533.
48. — Eurotransplant. (2019) Annual Report 2019, Eurotransplant International Foundation, <https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2020/06/Annual-Report-2019.pdf>
49. — Farouk, S.S., Rein, J.L. (2020) The Many Faces of Calcineurin Inhibitor Toxicity- What the FK? *Adv Chronic Kidney Dis*, 27, 56-66.
50. — Fujikura, K., Ingelman-Sundberg, M., Lauschke, V.M. (2015) Genetic variation in the human cytochrome P450 supergene family. *Pharmacogenet Genomics*, 25, 584-594.
51. — Fukudo, M., Yano, I., Yoshimura, A., Masuda, S., Uesugi, M., Hosohata, K., Katsura, T., Ogura, Y., Oike, F., Takada, Y., Uemoto, S., Inui, K. (2008) Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related

- renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*, 18, 413-423.
52. — Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 77, 493-509.
53. — Gasser, T.C., Ebert, S.C., Graversen, P.H., Madsen, P.O. (1987) Ciprofloxacin pharmacokinetics in patients with normal and impaired renal function. *Antimicrob Agents Chemother*, 31, 709-712.
54. — Gervasini, G., Garcia, M., Macias, R.M., Cubero, J.J., Caravaca, F., Benitez, J. (2012) Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int*, 25, 471-480.
55. — Gibson, G.G., Plant, N.J., Swales, K.E., Ayrton, A., El-Sankary, W. (2002) Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica*, 32, 165-206.
56. — Gijzen, V., Mital, S., van Schaik, R.H., Soldin, O.P., Soldin, S.J., van der Heiden, I.P., Nulman, I., Koren, G., de Wildt, S.N. (2011) Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients. *J Heart Lung Transplant*, 30, 1352-1359.
57. — Gijzen, V.M., van Schaik, R.H., Elens, L., Soldin, O.P., Soldin, S.J., Koren, G., de Wildt, S.N. (2013) CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics*, 14, 1027-1036.
58. — Girenavar, B., Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S. (2007) Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *J Food Sci*, 72, C417-421.
59. — GODT. (2021) Organ Donation and Transplantation Activities 2019 Report, (GODT) Global Observatory on Donation and Transplantation http://www.transplant-observatory.org/wp-content/uploads/2021/06/GODT2019-data_web_updated-June-2021.pdf
60. — Groll, A.H., Townsend, R., Desai, A., Azie, N., Jones, M., Engelhardt, M., Schmitt-Hoffman, A.H., Bruggemann, R.J.M. (2017) Drug-drug interactions

- between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P450 3A4. *Transpl Infect Dis*, 19.
61. — Gu, X., Ke, S., Liu, D., Sheng, T., Thomas, P.E., Rabson, A.B., Gallo, M.A., Xie, W., Tian, Y. (2006) Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem*, 281, 17882-17889.
62. — Guengerich, F.P. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv*, 3, 194-204.
63. — Guengerich, F.P. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*, 8, E101-111.
64. — Han, Y., Zhou, H., Cai, J., Huang, J., Zhang, J., Shi, S.J., Liu, Y.N., Zhang, Y. (2019) Prediction of tacrolimus dosage in the early period after heart transplantation: a population pharmacokinetic approach. *Pharmacogenomics*, 20, 21-35.
65. — Handschin, C., Meyer, U.A. (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, 55, 649-673.
66. — Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, 1770, 330-344.
67. — Harrison, C.A., Bastan, R., Peirce, M.J., Munday, M.R., Peachell, P.T. (2007) Role of calcineurin in the regulation of human lung mast cell and basophil function by cyclosporine and FK506. *Br J Pharmacol*, 150, 509-518.
68. — Hartyánszky, I., Horkay, F., Hüttl, T., Fazekas, L., Pólos, M., Daróczi, L., Heltai, K., Sax, B., Becker, D., Németh, E., Merkely, B., Szabolcs, Z. (2018) [Evolution of the Hungarian adult heart transplantation program]. *Orv Hetil*, 159, 1869-1875.
69. — Hazai, E., Vereczkey, L., Monostory, K. (2002) Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 1089-1094.
70. — Hesselink, D.A., van Schaik, R.H., van der Heiden, I.P., van der Werf, M., Gregoor, P.J., Lindemans, J., Weimar, W., van Gelder, T. (2003) Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and

- pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther*, 74, 245-254.
71. — Hill, N.R., Fatoba, S.T., Oke, J.L., Hirst, J.A., O'Callaghan, C.A., Lasserson, D.S., Hobbs, F.D. (2016) Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11, e0158765.
 72. — Holt, C.D. (2017) Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Anesthesiol Clin*, 35, 365-380.
 73. — Honkakoski, P., Sueyoshi, T., Negishi, M. (2003) Drug-activated nuclear receptors CAR and PXR. *Ann Med*, 35, 172-182.
 74. — Hukkanen, J. (2012) Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 5, 569-585.
 75. — Huttunen, K.M., Raunio, H., Rautio, J. (2011) Prodrugs--from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev*, 63, 750-771.
 76. — Itohara, K., Yano, I., Tsuzuki, T., Uesugi, M., Nakagawa, S., Yonezawa, A., Okajima, H., Kaido, T., Uemoto, S., Matsubara, K. (2019) A Minimal Physiologically-Based Pharmacokinetic Model for Tacrolimus in Living-Donor Liver Transplantation: Perspectives Related to Liver Regeneration and the cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) Genotype. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 8, 587-595.
 77. — Iwasaki, K. (2007) Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*, 22, 328-335.
 78. — Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., Saran, R., Wang, A.Y., Yang, C.W. (2013) Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 382, 260-272.
 79. — Ji, E., Choi, L., Suh, K.S., Cho, J.Y., Han, N., Oh, J.M. (2012) Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation. *Transplantation*, 94, 866-872.
 80. — Jiang, B., Cai, F., Gao, S., Meng, L., Liang, F., Dai, X., Xu, W., Chen, W. (2012) Induction of cytochrome P450 3A by Shexiang Baoxin Pill and its main components. *Chem Biol Interact*, 195, 105-113.

81. — Karunaratne, K., Taube, D., Khalil, N., Perry, R., Malhotra, P.A. (2018) Neurological complications of renal dialysis and transplantation. *Pract Neurol*, 18, 115-125.
82. — Kim, I.C., Youn, J.C., Kobashigawa, J.A. (2018) The Past, Present and Future of Heart Transplantation. *Korean Circ J*, 48, 565-590.
83. — Kim, I.W., Han, N., Burckart, G.J., Oh, J.M. (2014) Epigenetic changes in gene expression for drug-metabolizing enzymes and transporters. *Pharmacotherapy*, 34, 140-150.
84. — Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75, 376-386.
85. — Klomp, S.D., Manson, M.L., Guchelaar, H.J., Swen, J.J. (2020) Phenoconversion of Cytochrome P450 Metabolism: A Systematic Review. *J Clin Med*, 9.
86. — Kniepeiss, D., Renner, W., Trummer, O., Wagner, D., Wasler, A., Khoschorur, G.A., Truschnig-Wilders, M., Tscheliessnigg, K.H. (2011) The role of CYP3A5 genotypes in dose requirements of tacrolimus and everolimus after heart transplantation. *Clin Transplant*, 25, 146-150.
87. — Kobashigawa, J.A., Luu, M. (2017) In J. Kobashigawa (ed.), *Clinical Guide to Heart Transplantation*. 1 ed. Springer International Publishing.
88. — Kramer, A., Boenink, R., Stel, V.S., Santiuste de Pablos, C., Tomovic, F., Golan, E., Kerschbaum, J., Seyahi, N., Ioanou, K., Beltran, P., Zurriaga, O., Magaz, A., Slon Roblero, M.F., Gjorgjievski, N., Garneata, L., Arribas, F., Galvao, A.A., Bell, S., Ots-Rosenberg, M., Munoz-Terol, J.M., Winzeler, R., Hommel, K., Asberg, A., Spustova, V., Palencia Garcia, M.A., Vazellov, E., Finne, P., Ten Dam, M., Lopot, F., Trujillo-Aleman, S., Lassalle, M., Kolesnyk, M.O., Santhakumaran, S., Idrizi, A., Andrushev, A., Comas Farnes, J., Komissarov, K., Resic, H., Palsson, R., Kuzema, V., Garcia Bazaga, M.A., Ziginiskiene, E., Stendahl, M., Bonthuis, M., Massy, Z.A., Jager, K.J. (2021) The ERA-EDTA Registry Annual Report 2018: a summary. *Clin Kidney J*, 14, 107-123.
89. — Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C., Bishop, D.J. (2018) An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*, 13, e0196438.

90. — Kurose, K., Sugiyama, E., Saito, Y. (2012) Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27, 9-54.
91. — Kurzawski, M., Dabrowska, J., Dziewanowski, K., Domanski, L., Peruzynska, M., Drozdik, M. (2014) CYP3A5 and CYP3A4, but not ABCB1 polymorphisms affect tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics*, 15, 179-188.
92. — Kuypers, D.R. (2018) "What do we know about tacrolimus pharmacogenetics in transplant recipients?". *Pharmacogenomics*, 19, 593-597.
93. — Ladda, M.A., Goralski, K.B. (2016) The Effects of CKD on Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 23, 67-75.
94. — Lalande, L., Charpiat, B., Leboucher, G., Tod, M. (2014) Consequences of renal failure on non-renal clearance of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 53, 521-532.
95. — Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G., Thummel, K.E. (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 1271-1294.
96. — Langer, R. (2018) [The first five years of Hungary's Eurotransplant membership]. *Orv Hetil*, 159, 1695-1699.
97. — Lea-Henry, T.N., Carland, J.E., Stocker, S.L., Sevastos, J., Roberts, D.M. (2018) Clinical Pharmacokinetics in Kidney Disease: Fundamental Principles. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13, 1085-1095.
98. — Leblond, F., Guevin, C., Demers, C., Pellerin, I., Gascon-Barre, M., Pichette, V. (2001) Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 12, 326-332.
99. — Leucuta, S.E., Vlase, L. (2006) Pharmacokinetics and metabolic drug interactions. *Curr Clin Pharmacol*, 1, 5-20.
100. — Levesque-Sergerie, J.P., Duquette, M., Thibault, C., Delbecchi, L., Bissonnette, N. (2007) Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*, 8, 93.

101. — Lewis, A., Koukoura, A., Tsianos, G.I., Gargavanis, A.A., Nielsen, A.A., Vassiliadis, E. (2021) Organ donation in the US and Europe: The supply vs demand imbalance. *Transplant Rev (Orlando)*, 35, 100585.
102. — Li, D., Zhu, J.Y., Gao, J., Wang, X., Lou, Y.Q., Zhang, G.L. (2007) Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cytochrome P450 3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus. *Clin Chim Acta*, 383, 133-139.
103. — Li, Z., Jiang, Y., Guengerich, F.P., Ma, L., Li, S., Zhang, W. (2020) Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *J Biol Chem*, 295, 833-849.
104. — Limdi, N.A., Limdi, M.A., Cavallari, L., Anderson, A.M., Crowley, M.R., Baird, M.F., Allon, M., Beasley, T.M. (2010) Warfarin dosing in patients with impaired kidney function. *Am J Kidney Dis*, 56, 823-831.
105. — Lin, J.H., Lu, A.Y. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 35, 361-390.
106. — Liu, J., Chen, D., Yao, B., Guan, G., Liu, C., Jin, X., Wang, X., Liu, P., Sun, Y., Zang, Y. (2020) Effects of donor-recipient combinational CYP3A5 genotypes on tacrolimus dosing in Chinese DDLT adult recipients. *Int Immunopharmacol*, 80, 106188.
107. — Liu, J., Ouyang, Y., Chen, D., Yao, B., Lin, D., Li, Z., Zang, Y., Liu, H., Fu, X. (2018) Donor and recipient P450 gene polymorphisms influence individual pharmacological effects of tacrolimus in Chinese liver transplantation patients. *Int Immunopharmacol*, 57, 18-24.
108. — Lobo, E.D., Heathman, M., Kuan, H.Y., Reddy, S., O'Brien, L., Gonzales, C., Skinner, M., Knadler, M.P. (2010) Effects of varying degrees of renal impairment on the pharmacokinetics of duloxetine: analysis of a single-dose phase I study and pooled steady-state data from phase II/III trials. *Clin Pharmacokinet*, 49, 311-321.
109. — Maddison, J.E., Page, S.W., Dyke, T.M. (2008) In Maddison, J. E., Page, S. W. and Church, D. B. (eds.), *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*. W.B. Saunders, Edinburgh, pp. 27-40.

110. — Maldonado, A.Q., West-Thielke, P., Joyal, K., Rogers, C. (2021) Advances in personalized medicine and noninvasive diagnostics in solid organ transplantation. *Pharmacotherapy*, 41, 132-143.
111. — Martin-Gandul, C., Mueller, N.J., Pascual, M., Manuel, O. (2015) The Impact of Infection on Chronic Allograft Dysfunction and Allograft Survival After Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*, 15, 3024-3040.
112. — Martiny, V.Y., Miteva, M.A. (2013) Advances in molecular modeling of human cytochrome P450 polymorphism. *J Mol Biol*, 425, 3978-3992.
113. — Massad, M.G. (2004) Current trends in heart transplantation. *Cardiology*, 101, 79-92.
114. — Matsunaga, T., Maruyama, M., Matsubara, T., Nagata, K., Yamazoe, Y., Ohmori, S. (2012) Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, adpub.
115. — Meyer, U.A. (2004) Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*, 5, 669-676.
116. — Michaud, J., Dube, P., Naud, J., Leblond, F.A., Desbiens, K., Bonnardeaux, A., Pichette, V. (2005) Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol*, 144, 1067-1077.
117. — Mimura, H., Kobayashi, K., Xu, L., Hashimoto, M., Ejiri, Y., Hosoda, M., Chiba, K. (2015) Effects of cytokines on CYP3A4 expression and reversal of the effects by anti-cytokine agents in the three-dimensionally cultured human hepatoma cell line FLC-4. *Drug Metab Pharmacokinet*, 30, 105-110.
118. — Moini, M., Schilsky, M.L., Tichy, E.M. (2015) Review on immunosuppression in liver transplantation. *World J Hepatol*, 7, 1355-1368.
119. — Momper, J.D., Venkataramanan, R., Nolin, T.D. (2010) Nonrenal drug clearance in CKD: Searching for the path less traveled. *Adv Chronic Kidney Dis*, 17, 384-391.
120. — Monostory, K. (2018) In Tsoufas, G. (ed.), *Organ Donation and Transplantation - Current Status and Future Challenges*. IntechOpen.
121. — Monostory, K., Dvorak, Z. (2011) Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr Drug Metab*, 12, 154-172.

122. — Monostory, K., Pascussi, J.M. (2008) Regulation of Drug-metabolizing Human Cytochrome P450s. *Acta Chim. Slov*, 55, 20-37.
123. — Monostory, K., Tóth, K., Kiss, Á., Háfra, E., Csikány, N., Paulik, J., Sárváry, E., Kóbori, L. (2015) Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*, 80, 1429-1437.
124. — Munakata, M., Tsuchiya, S. (2008) Residual effect of a 7-amino metabolite of clonazepam on GABAA receptor function in the nucleus reticularis thalami of the rat. *Epilepsia*, 49, 1803-1808.
125. — Naik, P., Sritharan, V., Bandi, P., Madhavarapu, M. (2013) A single centre prospective study of liver function tests in post liver transplant patients. *Indian J Clin Biochem*, 28, 38-45.
126. — Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T. (2006) Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21, 437-457.
127. — Naushad, S.M., Pavani, A., Rupasree, Y., Hussain, T., Alrokayan, S.A., Kutala, V.K. (2019) Recipient ABCB1, donor and recipient CYP3A5 genotypes influence tacrolimus pharmacokinetics in liver transplant cases. *Pharmacol Rep*, 71, 385-392.
128. — Nelson, D.R. (2006) Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol*, 320, 1-10.
129. — Nelson, D.R. (2009) The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics*, 4, 59-65.
130. — Nelson, D.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J. (2013) The cytochrome P450 genesis locus: the origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20120474.
131. — Nelson, D.R., Nebert, D.W. (2018). 22. 01. 2018. ed. John Wiley & Sons Ltd, eLS: Essential for Life Science, pp. 1-19.
132. — Nolin, T.D., Frye, R.F., Le, P., Sadr, H., Naud, J., Leblond, F.A., Pichette, V., Himmelfarb, J. (2009) ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam. *J Am Soc Nephrol*, 20, 2269-2276.

133. — Nolin, T.D., Frye, R.F., Matzke, G.R. (2003) Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 42, 906-925.
134. — Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T., Terasaki, T. (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*, 40, 83-92.
135. — Okello, J.B., Rodriguez, L., Poinar, D., Bos, K., Okwi, A.L., Bimenya, G.S., Sewankambo, N.K., Henry, K.R., Kuch, M., Poinar, H.N. (2010) Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. *PLoS One*, 5, e13931.
136. — Okubo, M., Murayama, N., Shimizu, M., Shimada, T., Guengerich, F.P., Yamazaki, H. (2013) CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J Toxicol Sci*, 38, 349-354.
137. — Omura, T., Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*, 237, 1375-1376.
138. — OVSZ. (2018a) Májátültetések száma Magyarországon 1995-2018., Országos Vérellátó Szolgálat, https://www.ovsz.hu/sites/default/files/szervadomanyozas_dokumentum/adatok/2018/4/9_Majatultetesek_szama_Magyarorszagon_1995-2018.pdf
139. — OVSZ. (2018b) Szívátültetések száma Magyarországon 1992-2018., Országos Vérellátó Szolgálat, https://www.ovsz.hu/sites/default/files/szervadomanyozas_dokumentum/adatok/2018/4/10_Szivatultetesek_szama_Magyarorszagon_1992-2018.pdf
140. — OVSZ. (2020) Szervdonációs- és transzplantációs aktivitás 2019-ben és 2020-ban, Országos Vérellátó Szolgálat, <https://www.ovsz.hu/sites/default/files/2019-2020-aktivitas.pdf>
141. — Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E., Zeldin, D.C. (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*, 34, 880-886.

142. — Pallet, N., Jannot, A.S., El Bahri, M., Etienne, I., Buchler, M., de Ligny, B.H., Choukroun, G., Colosio, C., Thierry, A., Vigneau, C., Moulin, B., Le Meur, Y., Heng, A.E., Subra, J.F., Legendre, C., Beaune, P., Alberti, C., Lorient, M.A., Thervet, E. (2015) Kidney transplant recipients carrying the CYP3A4*22 allelic variant have reduced tacrolimus clearance and often reach supratherapeutic tacrolimus concentrations. *Am J Transplant*, 15, 800-805.
143. — Pelkonen, O., Maenpaa, J., Taavitsainen, P., Rautio, A., Raunio, H. (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*, 28, 1203-1253.
144. — Pfaffl, M.W. (2004) In Bustin, S. A. (ed.), *A-Z of quantitative PCR*. International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA, pp. 87-112.
145. — Picard-Meyer, E., Peytavin de Garam, C., Schereffer, J.L., Marchal, C., Robardet, E., Cliquet, F. (2015) Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1. *Biomed Res Int*, 2015, 839518.
146. — Plummer, S.J., Conti, D.V., Paris, P.L., Curran, A.P., Casey, G., Witte, J.S. (2003) CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 928-932.
147. — Poulos, T.L., Johnson, E.F. (2015) In Ortiz de Montellano, P. R. (ed.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3-32.
148. — Provenzani, A., Notarbartolo, M., Labbozzetta, M., Poma, P., Vizzini, G., Salis, P., Caccamo, C., Bertani, T., Palazzo, U., Polidori, P., Gridelli, B., D'Alessandro, N. (2011) Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int J Mol Med*, 28, 1093-1102.
149. — Provenzani, A., Santeusano, A., Mathis, E., Notarbartolo, M., Labbozzetta, M., Poma, P., Provenzani, A., Polidori, C., Vizzini, G., Polidori, P., D'Alessandro, N. (2013) Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol*, 19, 9156-9173.
150. — Ramzy, D., Rao, V., Brahm, J., Miriuka, S., Delgado, D., Ross, H.J. (2005) Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg*, 48, 319-327.

151. — Rana, A., Gruessner, A., Agopian, V.G., Khalpey, Z., Riaz, I.B., Kaplan, B., Halazun, K.J., Busuttil, R.W., Gruessner, R.W. (2015) Survival benefit of solid-organ transplant in the United States. *JAMA Surg*, 150, 252-259.
152. — Riley, R.J., Grime, K., Weaver, R. (2007) Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3, 51-66.
153. — Rio, D.C., Ares, M., Jr., Hannon, G.J., Nilsen, T.W. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, pdb prot5439.
154. — Rizzo, M.A., Frediani, F., Granata, A., Ravasi, B., Cusi, D., Gallieni, M. (2012) Neurological complications of hemodialysis: state of the art. *J Nephrol*, 25, 170-182.
155. — Roberts, D.M., Sevastos, J., Carland, J.E., Stocker, S.L., Lea-Henry, T.N. (2018) Clinical Pharmacokinetics in Kidney Disease: Application to Rational Design of Dosing Regimens. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13, 1254-1263.
156. — Romagnani, P., Remuzzi, G., Glassock, R., Levin, A., Jager, K.J., Tonelli, M., Massy, Z., Wanner, C., Anders, H.J. (2017) Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17088.
157. — Rossi, A.P., Vella, J.P. (2016) Acute Kidney Disease After Liver and Heart Transplantation. *Transplantation*, 100, 506-514.
158. — Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T. (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*, 268, 6077-6080.
159. — Saiz-Rodriguez, M., Almenara, S., Navares-Gomez, M., Ochoa, D., Roman, M., Zubiaur, P., Koller, D., Santos, M., Mejia, G., Borobia, A.M., Rodriguez-Antona, C., Abad-Santos, F. (2020) Effect of the Most Relevant CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetic Parameters of 10 CYP3A Substrates. *Biomedicines*, 8.
160. — Schutte-Nutgen, K., Tholking, G., Suwelack, B., Reuter, S. (2018) Tacrolimus - Pharmacokinetic Considerations for Clinicians. *Curr Drug Metab*, 19, 342-350.
161. — Seden, K., Dickinson, L., Khoo, S., Back, D. (2010) Grapefruit-drug interactions. *Drugs*, 70, 2373-2407.
162. — Shafiee, M.A., Chamanian, P., Shaker, P., Shahideh, Y., Broumand, B. (2017) The Impact of Hemodialysis Frequency and Duration on Blood Pressure

- Management and Quality of Life in End-Stage Renal Disease Patients. *Healthcare (Basel)*, 5.
163. — Shah, R.R. (2017) Pharmacogenetics and precision medicine: Is inflammation a covert threat to effective genotype-based therapy? *Ther Adv Drug Saf*, 8, 267-272.
164. — Shah, R.R., Shah, D.R. (2012) Personalized medicine: is it a pharmacogenetic mirage? *Br J Clin Pharmacol*, 74, 698-721.
165. — Shah, R.R., Smith, R.L. (2015) Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol*, 79, 222-240.
166. — Shao, J., Wang, C., Fu, P., Chen, F., Zhang, Y., Wei, J. (2020) Impact of Donor and Recipient CYP3A5*3 Genotype on Tacrolimus Population Pharmacokinetics in Chinese Adult Liver Transplant Recipients. *Ann Pharmacother*, 54, 652-661.
167. — Shebley, M., Kent, U.M., Ballou, D.P., Hollenberg, P.F. (2009) Mechanistic analysis of the inactivation of cytochrome P450 2B6 by phencyclidine: effects on substrate binding, electron transfer, and uncoupling. *Drug Metab Dispos*, 37, 745-752.
168. — Shi, W.L., Tang, H.L., Zhai, S.D. (2015) Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0127995.
169. — Shukla, S., Jhamtani, R.C., Dahiya, M.S., Agarwal, R. (2017) A novel method to achieve high yield of total RNA from zebrafish for expression studies. *International Journal of Bioassays*, 6, 5383-5385.
170. — Simon, F., Garcia, J., Guyot, L., Guitton, J., Vilchez, G., Bardel, C., Chenel, M., Tod, M., Payen, L. (2019) Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells. *AAPS J*, 22, 16.
171. — Soderlund, C., Radegran, G. (2015) Immunosuppressive therapies after heart transplantation--The balance between under- and over-immunosuppression. *Transplant Rev (Orlando)*, 29, 181-189.
172. — Sommerer, C., Meuer, S., Zeier, M., Giese, T. (2012) Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression. *Clin Chim Acta*, 413, 1379-1386.

173. — Song, Y., Li, C., Liu, G., Liu, R., Chen, Y., Li, W., Cao, Z., Zhao, B., Lu, C., Liu, Y. (2021) Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. *Clin Pharmacokinet*, 60, 585-601.
174. — Sparkes, T., Lemonovich, T.L., Practice, A.S.T.I.D.C.o. (2019) Interactions between anti-infective agents and immunosuppressants-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*, 33, e13510.
175. — Staatz, C.E., Tett, S.E. (2004) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*, 43, 623-653.
176. — Stel, V.S., Bruck, K., Fraser, S., Zoccali, C., Massy, Z.A., Jager, K.J. (2017) International differences in chronic kidney disease prevalence: a key public health and epidemiologic research issue. *Nephrol Dial Transplant*, 32, ii129-ii135.
177. — Stevens, P.E., Levin, A. (2013) Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*, 158, 825-830.
178. — Stiff, F., van Kuijk, S.M.J., Bekers, O., Christiaans, M.H.L. (2018) Increase in tacrolimus exposure after steroid tapering is influenced by CYP3A5 and pregnane X receptor genetic polymorphisms in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 33, 1668-1675.
179. — Sukhanov, V.A., Piruzyan, L.A. (2010) Role of physiological factors in predicting the risk of oncological diseases on the basis of the polymorphism of the xenobiotic metabolism enzyme system. *Human Physiology*, 36, 723-736.
180. — Sun, H., Frassetto, L.A., Huang, Y., Benet, L.Z. (2010) Hepatic clearance, but not gut availability, of erythromycin is altered in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther*, 87, 465-472.
181. — Taft, D.R. (2009) In Hacker, M., Messer, W. and Bachmann, K. (eds.), *Pharmacology*. Academic Press, San Diego, pp. 175-199.
182. — Taki-Eldin, A., Zhou, L., Xie, H.Y., Zheng, S.S. (2012) Liver regeneration after liver transplantation. *Eur Surg Res*, 48, 139-153.
183. — Tamási, V., Vereczkey, L., Falus, A., Monostory, K. (2003) Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflamm Res*, 52, 322-333.

184. — Tan, M.L., Yoshida, K., Zhao, P., Zhang, L., Nolin, T.D., Piquette-Miller, M., Galetin, A., Huang, S.M. (2018) Effect of Chronic Kidney Disease on Nonrenal Elimination Pathways: A Systematic Assessment of CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and OATP. *Clin Pharmacol Ther*, 103, 854-867.
185. — Tanaka, E. (1998) In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *J Clin Pharm Ther*, 23, 247-255.
186. — Temesvári, M., Kóbori, L., Paulik, J., Sárváry, E., Belic, A., Monostory, K. (2012) Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 341, 294-305.
187. — Tesena, P., Korchunjit, W., Taylor, J., Wongtawan, T. (2017) Comparison of commercial RNA extraction kits and qPCR master mixes for studying gene expression in small biopsy tissue samples from the equine gastric epithelium. *J Equine Sci*, 28, 135-141.
188. — Thatcher, S.A. (2015) DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clin Chem*, 61, 89-99.
189. — Tompkins, L.M., Wallace, A.D. (2007) Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol*, 21, 176-181.
190. — Toniutto, P., Zanetto, A., Ferrarese, A., Burra, P. (2017) Current challenges and future directions for liver transplantation. *Liver Int*, 37, 317-327.
191. — Tornio, A., Backman, J.T. (2018) Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Adv Pharmacol*, 83, 3-32.
192. — Tóth, K., Búdi, T., Kiss, Á., Temesvári, M., Háfra, E., Nagy, A., Szever, Z., Monostory, K. (2015) Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med*, 12, 199-207.
193. — Tóth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, Á., Háfra, E., Déri, M., Menus, Á., Bitter, I., Monostory, K. (2016) Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19, 1-9.
194. — Tóth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, Á., Háfra, E., Déri, M., Menus, Á., Bitter, I., Monostory, K. (2017) Potential Role of Patients' CYP3A-Status in Clozapine Pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol*, 20, 529-537.

195. — Tron, C., Lemaitre, F., Verstuyft, C., Petitcollin, A., Verdier, M.C., Bellissant, E. (2019) Pharmacogenetics of Membrane Transporters of Tacrolimus in Solid Organ Transplantation. *Clin Pharmacokinet*, 58, 593-613.
196. — Tucker, G.T. (2017) Personalized Drug Dosage - Closing the Loop. *Pharm Res*, 34, 1539-1543.
197. — Turner, R.M., Park, B.K., Pirmohamed, M. (2015) Parsing interindividual drug variability: an emerging role for systems pharmacology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 7, 221-241.
198. — Uesugi, M., Masuda, S., Katsura, T., Oike, F., Takada, Y., Inui, K. (2006) Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*, 16, 119-127.
199. — Uno, T., Wada, K., Matsuda, S., Terada, Y., Oita, A., Kawase, A., Takada, M. (2018) Impact of the CYP3A5*1 Allele on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Japanese Heart Transplant Patients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 43, 665-673.
200. — Urquhart, B.L., Nolin, T.D. (2020) In Kimmel, P. L. and Rosenberg, M. E. (eds.), *Chronic Renal Disease (Second Edition)*. Academic Press, pp. 1035-1051.
201. — van Duijnhoven, E.M., Boots, J.M., Christiaans, M.H., Stolck, L.M., Undre, N.A., van Hooff, J.P. (2003) Increase in tacrolimus trough levels after steroid withdrawal. *Transpl Int*, 16, 721-725.
202. — Vanholder, R., Van Biesen, W., Lameire, N. (2014) Renal replacement therapy: how can we contain the costs? *The Lancet*, 383, 1783-1785.
203. — Velenosi, T.J., Feere, D.A., Sohi, G., Hardy, D.B., Urquhart, B.L. (2014) Decreased nuclear receptor activity and epigenetic modulation associates with down-regulation of hepatic drug-metabolizing enzymes in chronic kidney disease. *FASEB J*, 28, 5388-5397.
204. — Velenosi, T.J., Fu, A.Y., Luo, S., Wang, H., Urquhart, B.L. (2012) Down-regulation of hepatic CYP3A and CYP2C mediated metabolism in rats with moderate chronic kidney disease. *Drug Metab Dispos*, 40, 1508-1514.
205. — Volak, L.P., Ghirmai, S., Cashman, J.R., Court, M.H. (2008) Curcuminoids inhibit multiple human cytochromes P450, UDP-glucuronosyltransferase, and

- sulfotransferase enzymes, whereas piperine is a relatively selective CYP3A4 inhibitor. *Drug Metab Dispos*, 36, 1594-1605.
206. — Wan, S., DeSmet, J.M., Antoine, M., Goldman, M., Vincent, J.L., LeClerc, J.L. (1996) Steroid administration in heart and heart-lung transplantation: is the timing adequate? *Ann Thorac Surg*, 61, 674-678.
207. — Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S.A., Cooke, G.E., Sadee, W. (2011) Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*, 11, 274-286.
208. — Waring, R.H. (2020) Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica*, 50, 9-18.
209. — Watanabe, H., Sugimoto, R., Ikegami, K., Enoki, Y., Imafuku, T., Fujimura, R., Bi, J., Nishida, K., Sakaguchi, Y., Murata, M., Maeda, H., Hirata, K., Jingami, S., Ishima, Y., Tanaka, M., Matsushita, K., Komaba, H., Fukagawa, M., Otagiri, M., Maruyama, T. (2017) Parathyroid hormone contributes to the down-regulation of cytochrome P450 3A through the cAMP/PI3K/PKC/PKA/NF-kappaB signaling pathway in secondary hyperparathyroidism. *Biochem Pharmacol*, 145, 192-201.
210. — Wei-lin, W., Jing, J., Shu-sen, Z., Li-hua, W., Ting-bo, L., Song-feng, Y., Sheng, Y. (2006) Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl*, 12, 775-780.
211. — Werk, A.N., Cascorbi, I. (2014) Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*, 96, 340-348.
212. — Wienkers, L.C., Heath, T.G. (2005) Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 825-833.
213. — Wilkinson, G.R. (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*, 352, 2211-2221.
214. — Yasukawa, K., Nemoto, D., Inouye, K. (2008) Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J Biochem*, 143, 261-268.
215. — Yeung, C.K., Shen, D.D., Thummel, K.E., Himmelfarb, J. (2014) Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int*, 85, 522-528.

216. — Yu, S., Wu, L., Jin, J., Yan, S., Jiang, G., Xie, H., Zheng, S. (2006) Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation. *Transplantation*, 81, 46-51.
217. — Zanger, U.M., Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 138, 103-141.
218. — Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*, 392, 1093-1108.
219. — Zhang, X., Lin, G., Tan, L., Li, J. (2018) Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: Pharmacogenetic considerations. *Biomed Pharmacother*, 102, 107-114.
220. — Zhang, Y., Zhang, L., Abraham, S., Apparaju, S., Wu, T.C., Strong, J.M., Xiao, S., Atkinson, A.J., Jr., Thummel, K.E., Leeder, J.S., Lee, C., Burckart, G.J., Lesko, L.J., Huang, S.M. (2009) Assessment of the impact of renal impairment on systemic exposure of new molecular entities: evaluation of recent new drug applications. *Clin Pharmacol Ther*, 85, 305-311.
221. — Zhang, Y.Y., Yang, L. (2009) Interactions between human cytochrome P450 enzymes and steroids: physiological and pharmacological implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5, 621-629.
222. — Zhou, S.-F., Liu, J.-P., Chowbay, B. (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews*, 41, 89-295.
223. — Zhou, Y., Ingelman-Sundberg, M., Lauschke, V.M. (2017) Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther*, 102, 688-700.
224. — Zordoky, B.N., El-Kadi, A.O. (2008) Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Curr Drug Metab*, 9, 122-128.

11 Saját publikációk jegyzéke

11.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke

1. **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*, 11, 21389. SJR Scopus - Multidisciplinary: D1 **IF: 4,380***
2. **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. SJR Scopus - Medicine (miscellaneous): Q2 **IF: 3,027**
3. 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. SJR Scopus - Pharmacology (medical): Q1 **IF:4,340***

11.2 Disszertációtól független publikációk jegyzéke

4. Fekete, F., Mangó, K., **Déri, 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: 4,380***
5. Gyimesi, M., Rauscher, A.Á., Suthar, S.K., Hamow, K.Á., Oravec, K., Lőrincz, I., Borhegyi, Z., **Déri, M.T.**, Kiss, Á.F., Monostory, K., Szabó, P.T., Nag, S., Tomasic, I., Krans, J., Tierney, P.J., Kovács, M., Kornya, L., Málnási-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, Á., Menus, Á., Tóth, K., **Déri, 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: **5,276**
7. Menus, Á., Kiss, Á., Tóth, K., Sirok, D., **Déri, 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: **4,380**
8. Monostory, K., Nagy, A., Tóth, K., Búdi, T., Kiss, Á., **Déri, M.**, Csukly, G. (2019) Relevance of CYP2C9 Function in Valproate Therapy. *Curr Neuropharmacol*, 17, 99-106.
IF: **4,668**
9. Kiss, Á.F., Vaskó, D., **Déri, M.T.**, Tóth, 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. Kovács, T., **Déri, M.**, Fülöp, A., Pálházy, T., Háfra, E., Sirok, D., Kiss, Á.F., Lotz, G., Szijártó, 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. Tóth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, Á., Háfra, E., **Déri, M.**, Menus, Á., Bitter, I., Monostory, K. (2017) Potential Role of Patients' CYP3A-Status in Clozapine Pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol*, 20, 529-537.
IF: **3,981**
12. Tóth, K., Csukly, G., Sirok, D., Belic, A., Kiss, Á., Háfra, E., **Déri, M.**, Menus, Á., Bitter, I., Monostory, K. (2016) Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient's CYP3A Status and NAT2 Genotype. *Int J Neuropsychopharmacol*, 19.
IF: **4,712**

*Az idén megjelent közleményekhez a folyóirat tavalyi impakt faktorát rögzítettem.

A megjelent első és társszerzős publikációim összesített impakt faktora: **47,564**

A disszertációhoz kapcsolódó megjelent publikációk összesített impakt faktora: **11,747**

12 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőm, Dr. Monostory Katalin áldozatos munkáját, hogy megteremtette a szakmai, infrastrukturális, kapcsolati és pénzügyi háttérrel mely, lehetővé tette kutatásom megvalósítását. Fáradságot nem ismerő hozzáállása, ötletei, munkámat segítő tanácsai, valamint szellemes aranyköpései és közmondásai nélkül nem jöhetett volna létre a dolgozatom.

Köszönöm korábbi Intézet és Jelenlegi Kutatóközpont vezetőnek Dr. Buday Lászlónak, valamint az Enzimológiai Intézet jelenlegi vezetőjének Dr. Szüts Dávidnak, hogy a TTK falai közt végezhettem kutatásaim.

Köszönöm Dr. Tantos Ágnesnek, hogy elvállalta disszertációm bírálatát a munkahelyi vitához.

Szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem, Gyógyszertudományi Doktori Iskolájának és vezetőjének Dr. Zelkó Románának, valamint az Experimentális és klinikai farmakológia program vezetőjének Dr. Szökő Évának, hogy a program keretében lehetőséget biztosítottak kutatásaim elvégzésére és hogy ajtjuk mindig nyitva állt, ha adminisztratív teendők végett kerestem fel őket.

A Semmelweis Egyetem Doktori Hivatala minden munkatársának hálás vagyok a türelmes segítség nyújtásért és hogy a közös cél érdekében minden kérdésem megválaszolták.

Köszönöm, a Semmelweis Egyetemen keresztül elnyert predoktori ösztöndíj támogatást, mely az “EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (the Higher Education Institutional Excellence Program (FIKP) of the Semmelweis University)” pályázat keretéből valósult meg.

Köszönettel tartozom Dr. Szakál-Tóth Zsófiának és Dr. Sax Balázsnak, a szívtranszplantált betegek vizsgálatának koordinálásában és létrejöttében betöltött esszenciális szerepéért, valamint Bernád Csillának, a klinikai adatok kigyűjtésében nyújtott segítségéért és a kilátástalannak tűnő pillanatokban bátorító szavaiért.

Köszönöm Dr. Sárváry Enikőnek a máj és vesetranszplantált betegek vizsgálatában nyújtott segítségét.

Köszönöm a Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak, különösen Dr. Tóth Katalinnak és Dr. Kiss Ádám Ferencnek, akik már kutatómunkám legelején pártfogásuk alá vettek, valamint Sirok Dávidnak, Mangó Katalinnak, Incze Evelynnek és Minus Annamarinak, hogy tanácsaikkal, ötleteikkel, nem ritkán tevékeny segítségükkel járultak hozzá munkám előremeneteléhez, és biztosították a jó hangulatot a közös munkával eltöltött mindennapokban. Hálás vagyok Fekete Ferencnek a sok hasznos meglátásért, tevékeny segítségért, illetve, hogy a legkritikusabb pillanatokban is bajtársam volt mind a mérések kivitelezésében-kiértékelésben, mind a gyógyszerelési adatok kigyűjtésében, mind pedig az említett tevékenységek miatt, és közben felbontott energiáitak elfogyasztásában.

Köszönettel tartozom a „Péntek Esti Mulatozás” néven aposztrofált önképző körnek, melynek fiatalos, de talán már egyre inkább már rutinosnak mondható tagjai, lelki, szellemi és esetenként fizikai támogatást is nyújtottak a kutatómunka édes terhének hordozásához.

Nem tudok elég hálás lenni a családomnak, minden tagjának, de különösen Édesanyámnak, Édesapámnak, Nagymamámnak és Öcsémnek akik tanulmányaim alatt végig türelemmel és töretlen bizalommal viseltettek irántam, remélem, hogy az életem során valamennyit vissza tudok nekik adni a rengeteg szeretetből és támogatásból.

S legvégül szeretném megköszönni a feltétlen bizalmat és szeretetet kedves menyasszonyomnak Ella Dorottyának.

13 Függelék

8. Táblázat: Végstádiumú vesebetegek és egészséges vesefunkcióval rendelkező szervdonorok demográfiai és klinikai paraméterei. Déri és munkatársai táblázata alapján [Déri et al. 2020]

	szervdonorok (normálisnak tekintett vesefunkcióval)	végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegek
N	110	105
életkor a mintavételezés idején (év) medián (min., max.)	48 (18,74)	48 (18, 75)
férfi/nő arány (%)	68/42 (61,8/38,2)	57/48 (54,3/45,7)
a halál kiváltó oka		
baleset, agyzúzódás (%)	28 (25,5)	
subarachnoidealis vérzés	25 (22,7)	
agyállományi vérzés	13 (11,8)	
subduralis vérzés	12 (10,9)	
stroke	12 (10,9)	
aneurizma	9 (8,2)	
hemangióma	7 (6,4)	
egyéb	4 (3,6)	
veseelégtelenséget kiváltó ok		
diabéteszes nephropathia		26 (24,8)
hipertenzív nephropathia		20 (19,0)
policystás vesebetegség		18 (17,1)
krónikus pyelonephritis		8 (7,6)
krónikus glomerulonephritis.		7 (6,7)
nephrosis szindróma		5 (4,8)
IgA nephropathia		2 (1,9)
gyógyszer indukált nephropathia		2 (1,9)
egyéb		17 (16,2)

9. Táblázat Szívtranszplantált betegek demográfiai adatai [Déri et al. 2021].

demográfiai adatok		CYP3A- státusz vizsgálata	CYP3A-státusz- takrolimusz terápia összefüggés vizsgálata
N		232	163
életkor a transzplantáció idején (év) medián (min; max.)		53,1 (19,5; 68,7)	52,6 (19; 68,7)
férfi/nő arány		175/57	128/35
testsúly a transzplantáció időpontjában (kg) medián (min; max)		78 (47; 120)	80 (47; 120)
primer betegség	nem-ishaemiás dilatatív cardiomyopathia	101	68
	ishaemiás cardiomyopathia	78	57
	congenitalis szívbetegség	17	11
	hypertrophiás cardiomyopathia	9	8
	restriktív cardiomyopathia	8	5
	arrhythmogen jobb kamrai dysplasia	3	2
	idiopathiás dilatatív cardiomyopathia	3	2
	egyéb	13	10

10. Táblázat A CYP3A5 donor/recipiens genotípus kombináció vizsgálatába bevont májtranszplantált betegek demográfiai adatai Csikány és munkatársai publikációja alapján [Csikány et al. 2021].

demográfiai adatok	CYP3A5*3 polimorfizmusra genotipizált máj recipiensek
N=69	
medián életkor a transzplantáció idején (év) (min; max.)	51 (19;63)
férfi/nő arány	39/29
medián testsúly a transzplantáció időpontjában (kg) (min; max)	76 (48;133)
primer betegség	
akut májelégtelenség	2 (2,9%)
krónikus májbetegség	
hepatitis C	33 (47,8%)
hepatitis B	4 (5,8%)
alkoholos májbetegség	11 (15,9%)
primer sclerotizáló cholangitis	8 (11,6%)
primer biliáris cirrhosis	1 (1,4%)
autoimmun hepatitis	1 (1,4%)
congenitalis fibrosis	2 (2,9%)
cryptogen cirrhosis	1 (1,4%)
tumor:hepatocelluláris carcinoma	1 (1,4%)
tumor:egyéb	2 (2,9%)
egyéb krónikus májbetegség	3 (4,3%)



End-stage renal disease reduces the expression of drug-metabolizing cytochrome P450s

Máté Tamás Déri¹ · Ádám Ferenc Kiss¹ · Katalin Tóth¹ · József Paulik² · Enikő Sárváry³ · László Kóbori³ · Katalin Monostory¹

Received: 16 December 2019 / Revised: 30 June 2020 / Accepted: 1 July 2020 / Published online: 8 July 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Background End-stage renal disease is an irreversible status of kidney dysfunction that reduces both renal and non-renal drug clearance. Accumulation of uremic toxins seems to modify the activities of drug-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes. The aim of the present work was to refine gene expression analysis for efficient and accurate quantification of CYP mRNAs in patients' leukocytes.

Methods We compared six liquid–liquid extraction reagents for RNA isolation and five reverse transcriptase kits for RNA-to-cDNA conversion, and developed quantitative polymerase chain reaction methods for duplex measurements of CYP target genes and the reference gene. The expression of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 in patients with end-stage kidney disease ($N=105$) and in organ donors with healthy kidney function ($N=110$) was compared.

Results Regarding the RNA yield and purity, TRIzol, Trizolate and TRI reagents were equal; however, TRI reagent was the most advantageous in terms of financial cost. Reverse transcription using Maxima First Strand cDNA Synthesis kit appeared to be the most efficient with the widest range for quantification of the target transcript. The refined method with the detection of various CYPs and the reference gene in duplex PCR efficiently quantified even the low-level CYP expression. In leukocytes of patients with end-stage renal disease, all four CYPs were expressed at significantly lower level than in organ donors with normal kidney function ($p < 0.0001$).

Conclusions Reduced CYP expression was a direct evidence of transcriptional down-regulation of CYP genes in patients with impaired kidney function.

Keywords End-stage renal disease · Cytochrome P450 · RNA extraction · Reverse transcription · Duplex quantitative PCR

Abbreviations

Cq	Quantification cycle
CYP	Cytochrome P450
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
gDNA	Genomic DNA
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	Quantitative PCR

Introduction

The incidence of chronic kidney disease is 10–16% in European adult population, and approximately 0.1–0.2% of these patients suffers from end-stage renal disease [1, 2]. The major risk factors are diabetes mellitus, hypertension, obesity and older age. Chronic kidney disease is primarily associated with the progression to kidney failure and with higher rates of cardiovascular disease (e.g., dysrhythmias, heart failure and stroke) [3, 4]; while, further serious complications include anemia, bone disease and decreased immune response [5]. End-stage renal disease is an irreversible status, accompanied with proteinuria and substantial reduction of glomerular filtration rate; therefore, patients with kidney failure require renal replacement therapy, including dialysis or kidney transplantation, unless fatal outcome can be predicted [1, 2, 6]. Although kidney transplantation is the optimal way of

✉ Katalin Monostory
monostory.katalin@ttk.mta.hu

¹ Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Magyar tudósok 2, 1117 Budapest, Hungary

² Nucleotest Bio Ltd., Tündérliget 3/2, 1038 Budapest, Hungary

³ Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University, Baross 23, 1082 Budapest, Hungary

renal replacement therapy, the majority of patients receive dialysis because of the shortage of transplantable organs or contraindication to kidney transplantation [1]. The chronic dialysis improves life expectancies of patients; however, the inter-dialytic fluid accumulation and the fluctuations in electrolytes and uremic toxins may cause additional complications, such as blood pressure fluctuation, myocardial hypoperfusion, reduction in cerebral perfusion and neurological complications [7–9].

Because of the comorbid conditions, the medication of patients with chronic kidney disease is complex with the highest pill burden amongst any chronic disease patients. The progressive decline in kidney function reduces the renal drug clearance, requiring dose adjustment. However, the non-renal drug metabolism (hepatic and intestinal) has also been demonstrated to decrease in patients with impaired kidney function, resulting in clinically significant changes in drug exposure [10, 11]. Cytochrome P450 (CYP) enzymes belonging to the CYP1–3 enzyme families play a dominant role in drug metabolism [12]. CYP activities can display more than 100-fold inter-individual variability [13], which is partly explained by genetic polymorphism. Transcriptional induction and suppression of CYP genes or inhibition of CYP enzyme activities can result in substantial modification in drug metabolism and, consequently, in drug exposure. CYP expression and activities are known to be influenced by non-genetic factors, such as diseases, medication, age, hormones or smoking, leading to phenoconversion and transient poor (or extensive) metabolism despite the wild CYP genotype [14]. Chronic renal disease has been suggested to modify CYP activities through direct inhibition of CYP enzymes and/or by transcriptional down-regulation by uremic toxins and mediators accumulating during renal impairment [15]. Small-molecular weight uremic toxins (indoxyl sulfate, hippuric acid, *p*-cresol, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) alone and particularly in combination decrease the function of CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 in hepatic microsomes [16, 17]. Furthermore, human uremic serum has been found to contain mediators (parathyroid hormone, cytokines) that reduce transcriptional CYP expression [18–20]. In rat kidney disease model, reduced binding of nuclear transcription factors, pregnane X receptor (PXR), hepatic nuclear factor 4 α (HNF-4 α) and RNA polymerase II to CYP2C11 and CYP3A2 promoter as well as diminished histone acetylation was demonstrated, contributing to down-regulation of CYPs [21]. Although *ex vivo* evidences for uremia-induced modifications of CYP expression appear convincing, we do not have applicable results gathered from human studies. Therefore, attention is necessary when extrapolating from functional data based on the studies with rat hepatocytes and heavily uremic animal models to the clinical care of patients with chronic kidney disease.

Pharmacogenetic approaches identifying loss-of-function (and gain-of-function) alleles of drug-metabolizing enzymes aim to determine permanent poor (and extensive) metabolizer phenotypes; whereas, the expression of these enzymes can provide information about transient modification of metabolizer phenotypes and about phenoconversion of genes more precisely. We have previously described a complex diagnostic tool (CYPtest™) that determines drug-metabolizing capacity by CYP-genotyping for clinically relevant CYP allelic variations and by the current CYP expression in leukocytes. mRNA levels of the major drug-metabolizing CYPs in leukocytes were proven to provide information about the hepatic CYP activities [13]. Continuous refinement of the basic methods for CYP expression is required for reliable estimation of patients' drug-metabolizing capacity, especially of those whose drug metabolism is expected to be compromised. The aim of the present work was to refine each step of CYP expression measurements (total RNA isolation, reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction [qPCR]), and to compare CYP expression (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4) in patients with end-stage kidney disease and in organ donors with healthy renal function.

Materials and methods

Blood samples

Blood samples from deceased organ donors ($N=110$) and from patients with end-stage kidney disease ($N=105$) were obtained from the Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University (Budapest, Hungary). The use of blood samples for scientific research was approved by the Hungarian Committee of Science and Research Ethics. The samples were taken at the time of explantation from hemodynamically stable brain death donors with a normal liver function; whereas, the sampling of the patients with end-stage kidney disease was performed at the time of their admission to the transplantation center for renal transplantation. Demographic data of organ donors and patients were recorded (Table 1). All subjects belonged to the Caucasian white population. The male/female ratio and the average age were similar in the two groups. Leukocytes were isolated from blood samples using red blood cell lysis buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). For optimization of RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR procedures, leukocytes pooled from three healthy volunteers were used.

Table 1 Demographic and clinical data of organ donors and patients with end-stage renal disease (ESRD)

	Organ donors	ESRD patients
Number	110	105
Gender: male/female (%)	68/42 (61.8%/38.2%)	57/48 (54.3%/45.7%)
Age at the time of sampling (years)		
Median (min, max)	48 (18, 74)	48 (18, 75)
Cause of death		
Accident, cerebral contusion (%)	28 (25.5%)	
Subarachnoid hemorrhage (%)	25 (22.7%)	
Cerebral hemorrhage (%)	13 (11.8%)	
Subdural hemorrhage (%)	12 (10.9%)	
Stroke (%)	12 (10.9%)	
Aneurysm (%)	9 (8.2%)	
Haemangioma (%)	7 (6.4%)	
Other	4 (3.6%)	
Cause of end-stage renal disease		
Diabetic nephropathy (%)		26 (24.8%)
Hypertensive nephropathy (%)		20 (19.0%)
Polycystic kidney disease (%)		18 (17.1%)
Chronic pyelonephritis (%)		8 (7.6%)
Chronic glomerulonephritis (%)		7 (6.7%)
Nephrotic syndrome (%)		5 (4.8%)
IgA nephropathy (%)		2 (1.9%)
Drug-induced nephropathy (%)		2 (1.9%)
Other (%)		17 (16.2%)

Total RNA isolation

Six commercially available RNA isolation reagents based on liquid–liquid extraction were compared in the terms of purity, total RNA yield and financial costs. All six reagents contain the combination of phenol with guanidinium thiocyanate: (1) TRIzol™ reagent (Invitrogen/ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), (2) TRI Reagent® (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA), (3) Trizolate Reagent® (UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen, Hungary), (4) RiboZol® RNA extraction reagent (Amresco LLC/VWR Life Scientific, Solon, OH, USA), (5) RNAzol® RT reagent (Molecular Research Center Inc.) and (6) NucleoZOL reagent (MACHEREY–NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). For appropriate comparison of the six RNA isolation reagents, the RNA was isolated from the same amount of cells (10^7) pooled from three healthy subjects. The leukocytes were suspended in 1 ml of each RNA extraction reagent. RNA isolation was performed according to the manufacturer's instructions. TRIzol™, TRI Reagent®, Trizolate Reagent® and RiboZol® RNA extraction reagent apply chloroform-induced phase separation; whereas, RNAzol® RT and NucleoZOL reagents require RNase-free water for precipitation of DNA and protein contaminants. Further steps of RNA precipitation with 2-propanol, RNA washing with 75% ethanol and

RNA reconstitution in RNase-free water were the same in each isolation procedure. RNA content and purity of the samples ($A_{260/280}$, $A_{260/230}$) were determined based on the UV/Vis spectra of the RNA solutions.

Reverse transcription

First-strand cDNA synthesis was performed by reverse transcription, and five commercially available cDNA synthesis kits were compared regarding the reverse transcription efficiency and the dynamic range: (1) Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), (2) qPCRBIO cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems Ltd., London, UK), (3) FastGene Scriptase Basic cDNA Kit (NIPPON Genetics Co. Ltd, Tokyo, Japan), (4) iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA) and (5) SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline GmbH, Luckenwalde, Germany). All five cDNA synthesis kits contain the combination of oligo(dT) with random hexamer primers. To avoid the template variation between assays, the same RNA sample isolated from the leukocyte pool of three volunteers was used for testing the cDNA synthesis kits. Reverse transcription was performed according to the manufacturers' instruction. A 51.2 pg–4 µg dilution range was assayed, and the dynamic range was determined using six 1:5 serial dilutions

of total RNA samples. A standard curve was plotted based on Cq values obtained from qPCR measurements using the diluted and transcribed RNA samples against the log of the total RNA content. The correlation coefficients, the slope of the standard curves and the efficiency were calculated for each cDNA synthesis kit.

Quantitative real-time PCR assays

For cDNA amplification, the KAPA Probe Fast qPCR kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used. The quantities of CYP mRNAs relative to that of the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were determined; therefore, GAPDH expression was set to 1 and CYP mRNA levels were normalized by GAPDH expression. For duplex analysis, the primers and probes for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 were optimized (Table 2). TaqMan probes were labeled with FAM (GAPDH) and HEX fluorophores (CYP probes) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). The one-step thermal profile of PCR consisted of 95 °C for 3 min, 50 cycles of 95 °C denaturation for 3 s and 58 °C amplification for 30 s (Bio-Rad CFX96 Touch™ real-time PCR system). The data were analyzed by the Bio-Rad CFX Maestro™ software.

Data analysis

CYP expression was determined in 110 organ donors and 105 patients with end-stage renal disease. Statistical analysis was carried out using GraphPad InStat (v3.05; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Distribution of CYP expression data was analyzed by Kolmogorov–Smirnov test, and between-group differences were calculated by Mann–Whitney *U* test. Three categories of CYP expression

were applied to describe low, normal and high expressers. The cut-off values for CYP mRNA levels in leukocytes have been previously established on the basis of the cut-off values for the hepatic CYP enzyme activities (CYP1A2: phenacetin *O*-dealkylation; CYP2C9: tolbutamide 4-hydroxylation; CYP2C19: mephenytoin 4'-hydroxylation; CYP3A4: nifedipine oxidation or midazolam 1'- and 4-hydroxylation) [13]. The cut-off values for CYP1A2 (10^{-5} and 5×10^{-4}), CYP2C9 (2×10^{-6} and 10^{-5}), CYP2C19 (10^{-6} and 10^{-5}) and CYP3A4 (10^{-6} and 10^{-4}) in leukocytes allow a distinction between low, normal and high expressers. The prevalence of low, normal and high expressers in patients with end-stage renal disease was compared to that of organ donors by the use of Chi-squared test (GraphPad InStat v3.05, San Diego, CA, USA). A *p* value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

The CYPtest™ diagnostic system has been developed for the estimation of patients' drug-metabolizing capacity through integrative analysis of clinically relevant mutations in CYP genes and the mRNA expression of major drug-metabolizing CYPs. Peripheral leukocytes are appropriate biological samples for providing information about CYP-mediated drug metabolism because they are easily accessible, display active RNA synthesis and reflect hepatic activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 enzymes [13]. Hepatic CYP activities and CYP mRNA concentrations in leukocytes seem to transiently decrease to extremely low levels in patients with some acute or chronic disease. For precise and reliable measurement of low CYP expression in limited amounts of samples, the procedures of RNA isolation,

Table 2 Sequences of PCR primers and probes for assaying relative CYP mRNA expression

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')
CYP1A2 forward primer	GTC AAT GAC ATC TTT GGA GCA G
CYP1A2 reverse primer	CCT GCC AAT CAC AGT GTC C
CYP1A2 probe	HEX-TGA CAC AGT CAC CAC AGC CAT CTC C-BHQ1
CYP2C9 forward primer	AGA TAG GTA TTA AGG ACA TCA GC
CYP2C9 reverse primer	CCA CTA TGG GTT TCA GGC
CYP2C9 probe	HEX-ACC AAT CTC TCA AAG GTC TAT GGC-BHQ1
CYP2C19 forward primer	ATC AGG ATT GTA AGC ACC C
CYP2C19 reverse primer	TTC TCC AAA ATA TCA CTT TCC AT
CYP2C19 probe	HEX-CCA CTA TCA TTG ATT ATT TCC CGG-BHQ1
CYP3A4 forward primer	TGT CCT ACC ATA AGG GCT T
CYP3A4 reverse primer	CAC AGG CTG TTG ACC A
CYP3A4 probe	HEX-AGT ATG GAA AAG TGT GGG GCT T-BHQ1
GAPDH forward primer	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C
GAPDH reverse primer	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C
GAPDH probe	FAM-TGG GGA AGG TGA AGG TCG-BHQ1

RNA-to-cDNA conversion and qPCR required improvement of the basic CYPtest™ methods.

Comparison of liquid–liquid RNA extraction methods

The extraction of high-quality RNA is important for a sensitive quantitative analysis of gene expression. Solid-phase extraction kits generally produce high-purity RNA samples; however, liquid–liquid extraction seemed to be more efficient in isolation of transcripts expressed in relatively small amounts. To achieve high-yield and quality of RNA, six commercially available RNA extraction reagents (TRIzol™ reagent, TRI Reagent®, Trizolate Reagent®, RiboZol® RNA extraction reagent, RNazol® RT reagent and NucleoZOL reagent) were compared using the same leukocyte pool. RiboZol reagent yielded the highest concentration of total RNA, whereas the RNA yields were significantly lower ($p < 0.05$) using the other reagents (Table 3). The 260/280 and 260/230 ratios are used for the evaluation of the purity of RNA samples, and are expected to be approximately 2 and in the range of 2.0–2.2, respectively. The 260/280 ratios were around 2 except for RiboZol and RNazol® RT reagents; whereas, the 260/230 ratios were in the acceptable range only in the samples isolated with TRIzol, Trizolate and TRI reagents. Regarding the RNA yield and purity, TRIzol, Trizolate and TRI reagents were considered to be equal; however, TRI reagent was the most favorable in terms of financial cost (Table 3).

Optimization of reverse transcription coupled to qPCR

For measuring low CYP expression levels, it is essential to use highly sensitive and efficient reverse transcriptase. Five reverse transcription kits (Maxima First Strand, qPCRBIO, FastGene Scriptase Basic, iScript and SensiFAST cDNA synthesis kits) were tested on the basis of CYP3A4 assay using the RNA sample from the leukocyte pool. The analytical sensitivity, linearity and efficiency of amplification were

compared using the 1:5 serial dilutions of RNA ranged from 4 µg to 51.2 pg per reaction. The quality of the standard curves was evaluated using the slope, correlation coefficient (R^2) and the amplification efficiency. The theoretical doubling is expected to produce a standard curve with the slope of -3.3 ; whereas, $R^2 > 0.9$ and the efficiency ranged between 90 and 110% are considered to be acceptable.

Transcription of 51.2-pg total RNA per reaction was found to be below the detection limit of CYP3A4 mRNA for all five transcription kits. For qPCRBIO, FastGene Scriptase and SensiFAST cDNA Synthesis kits, the limit of detection was even higher (6400 pg) than for Maxima First Strand and iScript cDNA Synthesis kits (256 pg) (Table 4). Analyzing the linearity of cDNA synthesis, the correlation coefficients (R^2) of the RNA concentration–quantification cycle (C_q) standard curves were higher than 0.9 for Maxima First Strand, iScript and SensiFAST cDNA Synthesis kits; whereas, qPCRBIO and FastGene Scriptase cDNA Synthesis kits displayed weak correlation (Fig. 1; Table 4). The slope of the standard curves and consequently the qPCR efficiency were the closest to the theoretical values (-3.3 and 100%, respectively) when Maxima First Strand and iScript cDNA Synthesis kits were used for reverse transcription. While qPCRBio, FASTgene Scriptase and SensiFAST cDNA Synthesis kits far exceeded the optimal efficiency. Since the PCR components (primers, probe and PCR reagent) were consistent across all five cDNA synthesis kits, the efficiency differences were attributed to the reverse transcriptase itself. Furthermore, Maxima First Strand cDNA Synthesis kit displayed the widest dynamic range for CYP3A4 expression; therefore, it was used for reverse transcription for the subsequent qPCR measurements.

The qPCR methods for CYP expression described by Temesvári et al. [13] applied FAM-labeled probes that did not allow the expression analysis of target and reference genes in a multiplex reaction. In addition to the considerable saving of time, efforts, samples and reagents, a successful multiplex PCR assay provides more precise evaluation of the target gene expression relative to the reference gene. Therefore, the oligonucleotide components of the singleplex

Table 3 Comparison of RNA extraction kits

RNA extraction reagent	RNA concentration (ng/µl) ^a	260/280 ratio ^a	260/230 ratio ^a	Price of 200 ml reagent (Euro)
TRIzol reagent	259.5 ± 27.43	2.002 ± 0.031	2.007 ± 0.079	580
TRI reagent	235.7 ± 11.94	2.006 ± 0.034	2.115 ± 0.007	182
Trizolate reagent	267.8 ± 22.80	1.992 ± 0.031	2.007 ± 0.051	212
RiboZol reagent	336.2 ± 37.55	1.870 ± 0.101	1.640 ± 0.321	230
RNazol RT reagent	250.8 ± 41.34	1.795 ± 0.163	1.150 ± 0.330	185
NucleoZOL reagent	256.6 ± 68.98	1.907 ± 0.074	1.413 ± 0.359	230

^aMean ± SD of three extractions from the same leukocyte pool

Table 4 Comparison of reverse transcriptase (RT) kits using the standard curves fitted to C_q values for CYP3A4

RT kit	Slope ^a	R ^{2a}	Efficiency (%) ^a	Limit of detection (pg of total RNA)	Dynamic range	
					observed	recommended by the manufacturer
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	-3.187 ± 0.155	0.996 ± 0.002	106.2 ± 7.08	256	256 pg–4 µg	1 pg–5 µg
qPCR BIO cDNA Synthesis Kit	-1.648 ± 0.628	0.762 ± 0.192	404.7 ± 251.13	6400	6400 pg–0.8 µg	4 pg–0.1 µg
FastGene Scriptase Basic cDNA Kit	-1.881 ± 0.307	0.775 ± 0.049	249.3 ± 70.23	6400	6400 pg–0.8 µg	1000 pg–5 µg
iScript™ cDNA Synthesis Kit	-2.849 ± 0.052	0.958 ± 0.007	124.8 ± 3.35	256	1280 pg–0.8 µg	0.1 pg–1 µg
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	-2.218 ± 0.231	0.937 ± 0.037	182.4 ± 32.81	6400	6400 pg–0.8 µg	< 1 µg

^aMean ± SD of the dilution set using three RNA samples extracted from the same leukocyte pool

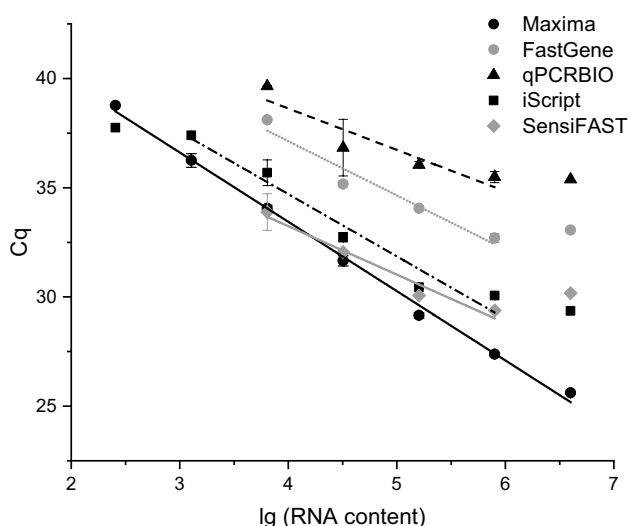


Fig. 1 Comparison of reverse transcriptase kits using C_q (quantification cycle) values for CYP3A4. The 1:5 serial dilutions of the RNA sample were reverse transcribed using Maxima First Strand, qPCR-BIO, FastGene Scriptase Basic, iScript and SensiFAST cDNA synthesis kits, and PCR was performed for quantification of CYP3A4. The symbols and whiskers indicate the mean and standard deviation (mean ± SD) of three parallel measurements; whereas, the lines are fitted to the linear concentration range

qPCR in CYPtest™ were redesigned applying HEX-labeled probes for CYPs and FAM-labeled probe for the reference GAPDH expression (Table 2). The primers were designed in two consecutive exons separated by an intron on the corresponding gDNA (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19) or to the exon–exon junction (CYP3A4, GAPDH); therefore, the amplicon was generated exclusively from the CYP mRNA derived cDNA, and gDNA contamination did not produce false reaction. The redesigned primer–probe combinations and quantification of each gene product were assayed using 5-log serial dilutions of cDNA templates. The amplification efficiency varied between 94.8 and 106.2%, and R² was higher than 0.99 for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 and GAPDH.

CYP expression in patients with end-stage kidney disease

The expression of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 was determined in leukocytes of 105 patients with end-stage renal disease and 110 healthy organ donors (Fig. 2a). The extremely suppressed CYP expression in patients' leukocytes required method optimization for appropriate detection of CYP mRNAs. The refined methods of RNA extraction using TRI Reagent, reverse transcription using Maxima First Strand cDNA synthesis kit and redesigned oligonucleotide sequences for duplex qPCR (Table 2) were applied for assaying CYP expression. In organ donors, CYP expression displayed approximately a two-magnitude difference between the highest and lowest mRNA levels except for CYP3A4 that exhibited much wider variation (5-magnitude). In patients with end-stage renal disease, high inter-individual variations were observed in CYP expression with 5- to 7-magnitude differences between the highest and lowest levels. Furthermore, in patients with impaired renal function, mRNA levels of all four CYPs were found to be significantly lower than in organ donors. The median values of CYP expression displayed substantial differences between the two groups ($p < 0.0001$) with the greatest in CYP2C9 (600-fold) and the lowest in CYP2C19 (15-fold) (Fig. 2a).

On the basis of CYP expression in leukocytes, hepatic activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 were also estimated in patients with end-stage renal disease and in organ donors using the cut-off values for distinction of poor, intermediate and extensive metabolizers described by Temesvári et al. [13]. Comparing organ donors and the patients with end-stage renal disease, significant differences were observed in the proportion of subjects expressed CYP mRNA at low, normal and high levels (Chi² for CYP1A2: 40.2, for CYP2C9: 87.9, for CYP2C19: 47.2, for CYP3A4: 29.9; $df = 2$, $p < 0.0001$) (Fig. 2b). CYP expression was low in most of the patients with impaired renal function (51–77%); while the ratio of high CYP expressers was 0–7%. In organ donors with healthy renal function, we found much

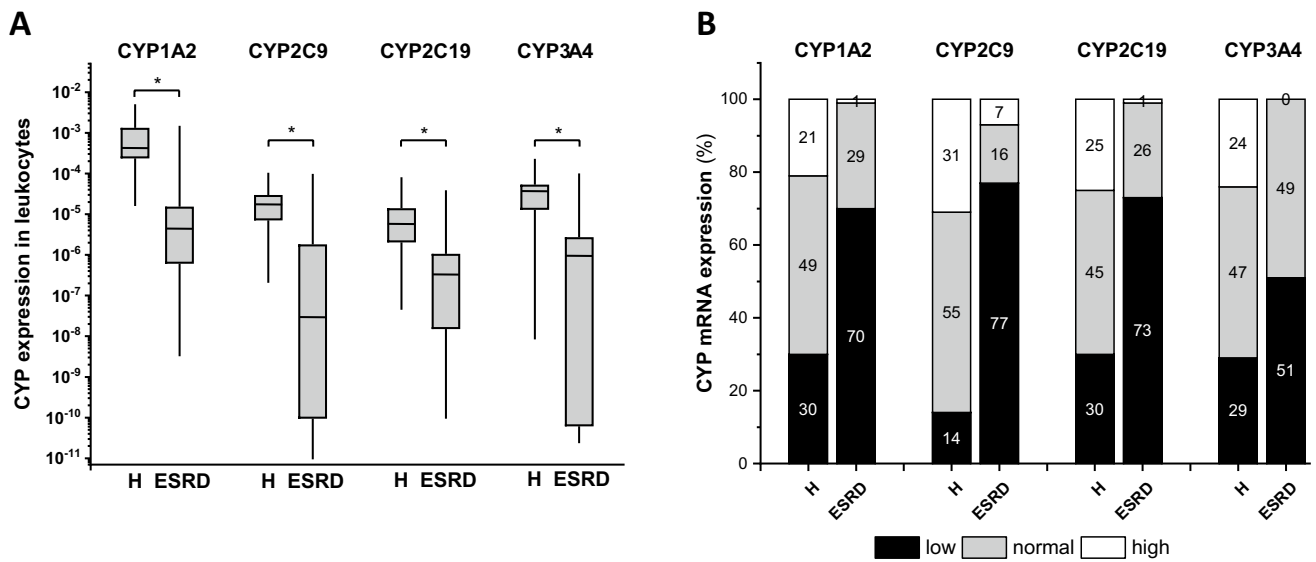


Fig. 2 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 expression in leukocytes of the patients with end-stage renal disease ($N=105$) and of organ donors with normal kidney function ($N=110$) (a), and the ratio of patients/donors expressing CYPs at low, normal or high levels (b). a CYP mRNA values are presented using the median (line), range (box) and minimum–maximum values (whiskers). Between-group differences were calculated by Mann–Whitney U test. b The

cut-off values for CYP mRNA levels (CYP1A2: 10^{-5} and 5×10^{-4} , CYP2C9: 2×10^{-6} and 10^{-5} , CYP2C19: 10^{-6} and 10^{-5} , CYP3A4: 10^{-6} and 10^{-4}) in leukocytes allowed a distinction between low, normal and high expressers. The numbers indicate the prevalence (%) of low, normal and high expressers in patients with end-stage renal disease and in organ donors. $*p < 0.0001$; ESRD end-stage renal disease; H organ donors with normal kidney function

less subjects with low CYP expression (30% or less), and the number of high expresser subjects was also remarkable (21–31%).

Discussion

For personalized medication, it is essential to obtain information about patients’ drug-metabolizing capacity [14, 22]. Hepatic enzymes belonging to CYP1–3 families are primarily responsible for the biotransformation of drugs with major contributions of CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2 and CYP2B6; therefore, any information on hepatic CYP activities is of significant importance for the estimation of drug-metabolizing capacity [12]. The first step for the estimation of CYP status and drug-metabolizing capacity is the identification of clinically relevant CYP alleles resulting in reduced and no enzyme activities or even extensive and ultrafast metabolism [23, 24]. Transient decrease (or elevation) of hepatic CYP activities as a consequence of non-genetic factors can partly be assessed from CYP expression in leukocytes. Although CYP expression and activities in leukocytes are by magnitude much lower than in the liver, the leukocyte expression of several CYPs (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4) appears to reflect the hepatic activities [13]. It should be noted that leukocytes are inappropriate cells for the assessment of hepatic CYP2B6 and CYP2D6 activities because there are

no association between their hepatic activities and leukocyte expression [13]. Furthermore, patients’ CYP3A-substrate-metabolizing capacity depends on the activity of CYP3A4 rather than CYP3A5 because (1) the amount of CYP3A4 in hepatic CYP3A pool substantially exceeds that of CYP3A5 (85 and 5%, respectively) [25]; (2) due to the defective *CYP3A5*3* allele common in Caucasian white populations (88–97%) [12], CYP3A5 expression is restricted to those subjects who carry the functional wild-type *CYP3A5*1* allele; (3) the activity of CYP3A5 is substrate specific. Functional CYP3A5 (*CYP3A5*1* allele) does not influence the pharmacokinetics or pharmacological effects of several CYP3A substrates (clonazepam, fluvastatin, pravastatin, carbamazepine), whereas the clearance of others, such as tacrolimus, by CYP3A5 is significantly higher than by CYP3A4; therefore, *CYP3A5*1* carrier patients require double dose of tacrolimus for therapeutic blood concentration than those with *CYP3A5*3/*3* genotype. It also means that identification of *CYP3A5*1* is appropriate for the estimation of tacrolimus-metabolizing capacity, and no further CYP3A5 expression analysis is required [26].

Detection of permanent (genetic) variations and transient changes in CYP expression can facilitate the identification of high-risk patients [26–29]. Due to the potential accumulation of uremic toxins, CYP genes were expected to exhibit low expression in leukocytes of patients with impaired kidney function. Therefore, the workflow steps of CYP expression analysis using the qPCR technique (RNA extraction,

reverse transcription and qPCR for various CYPs) required refinement of the method described by Temesvári et al. [13]. For gene expression analysis, separation of RNA from other cellular macromolecules (DNA, proteins) by either liquid–liquid or solid-phase extraction are critical for yielding high-quality RNA in sufficient amount. Various solid-phase extraction methods are available that can isolate high-purity RNA samples. Besides further advantages of solid-phase extraction, such as good reproducibility, reduction of hazardous chemical consumption and easy automation, the low yield of RNA is a major drawback [30, 31]. By solid-phase method, there is often no chance for extraction of target RNA expressed at low concentration. Liquid–liquid extraction generally yields significantly higher amount of RNA than solid-phase extraction methods [32]; however, to obtain high-purity RNA samples, a judicious choice of the most suitable liquid–liquid extraction method is required. The most common methods apply phenol–guanidinium thiocyanate reagents with or without phase-separation by the addition of chloroform. Although the RNA extraction kits tested in the present study followed the same subsequent steps of RNA precipitation from the aqueous phase with 2-propanol and RNA purification with ethanol [33–35], the RNA yield and purity from leukocytes were different. RiboZol reagent yielded the highest quantity of RNA; whereas, TRIzol, Trizolate and TRI reagents produced RNA with the lowest contamination. TRI reagent was nevertheless the most advantageous because of the reasonable financial cost. gDNA impurities in RNA samples can significantly impact the qPCR leading to overestimation of target mRNA expression and to inaccurate expression results. Contaminating gDNA can be estimated by PCR assays omitting reverse transcription in parallel of qPCR coupled with reverse transcription; however, the additional assay is costly and consumes RNA sample available in limited amount. An alternative method is the RNase-free DNase digestion of RNA samples prior to reverse transcription and qPCR assay. Although the DNase treatment followed by DNase inactivation can substantially reduce gDNA contamination, the additional steps increase the time of sample preparation procedure. gDNA insensitive assay with proper design of primers is a time and reagent saving alternative method that is applicable for many eukaryotic genes [36]. Designing a primer sequence at exon–exon junction or including a large intron between the forward and reverse primers can ensure the amplification exclusively from cDNA; therefore, gDNA does not interfere with gene expression analysis. Since CYPs and the reference GAPDH are multi-exon genes, we could design gDNA insensitive assays.

Reverse transcription of RNA template is another crucial step in quantitative assay of gene expression. The reverse transcriptase enzyme is generally expected to be efficient in a wide dynamic range converting high- and low-abundance

transcripts into cDNA [37–39]; however, the manufacturers' specifications inform merely about the total RNA quantity and not about the specific target transcript that is capable to be reverse transcribed by the particular enzyme. Furthermore, the manufacturers' specifications rarely provide information whether the reverse transcription product is directly adaptable to qPCR or post-reverse transcription processing (dilution or cleaning) is required [38]. For CYP expression analysis, the major suitability criteria for reverse transcriptase were the enzyme efficiency with wide dynamic range and direct PCR-adaptability. All five cDNA synthesis kits tested in the present study contained modified MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase which has been reported to display higher cDNA synthesis rate than that of AMV (Avian Myeloblastosis Virus) [40, 41]. Furthermore, all cDNA synthesis kits apply the same priming strategy with the combination of random hexamer and anchored oligo(dT) primers that can provide optimal sensitivity and accuracy of first strand cDNA synthesis. Despite the same type of reverse transcriptase and priming, these cDNA synthesis kits showed considerable variations in efficiency, dynamic range and detection limit. iScript™ and Maxima First Strand cDNA Synthesis kits displayed the lowest detection limit; however, the efficiency and the dynamic range of iScript™ lagged behind those of Maxima First Strand cDNA Synthesis kit. Maxima First Strand cDNA Synthesis kit appeared to be the most efficient with the widest range for quantification of target transcript. A major difference between cDNA synthesis kits is the RNase H activity degrading the original RNA template after cDNA synthesis. iScript™ and Maxima First Strand cDNA Synthesis kits retained the RNase H activity; whereas, reverse transcriptase in qPCRBIO, SensiFAST™ cDNA Synthesis kits and FastGene Scriptase Basic cDNA kit has reduced RNase H activity. Reduced or no RNase H activity is an advantage in production of large cDNA; however, it entails a disadvantage to the subsequent quantitative PCR, because the RNA template can bind to the cDNA and blocks the primer binding to the cDNA template during PCR [36]. An additional cleaning step is required before qPCR that increases the cDNA production time and the waste of cDNA. Therefore, a first-strand cDNA synthesis kit having RNase H activity is an appropriate choice of reverse transcription directly coupled with qPCR. The background RNA content in reverse transcription can also influence the sensitivity of subsequent PCR [37]; however, CYP expression was determined relative to the reference GAPDH expression in duplex assays, and the amount of background RNA was, thus, the same for the expression analysis of the target and the reference genes.

To obtain reliable CYP expression results even in a broad range of transcript amounts, it was essential to systematically optimize RNA extraction and reverse

transcription coupled to qPCR. Careful application of TRI Reagent yielded sufficient amount of high-quality RNA from leukocytes, and reverse transcription by Maxima First Strand cDNA Synthesis kit efficiently produced cDNA template directly transposable to qPCR; whereas, the detection of various CYPs and the reference GAPDH in duplex PCR improved the assay reliability. The refined CYP expression analysis indicated a wide concentration range of CYP mRNAs in leukocytes of patients with impaired kidney function. Furthermore, the average CYP expression was significantly lower in patients with end-stage kidney disease than in organ donors. Our findings are considered to be a direct evidence of transcriptional down-regulation of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A4* genes in patients with kidney dysfunction, confirming some of the clinical observations of reduced CYP-mediated drug metabolism [11, 42–47]. As a consequence of a decrease in *CYP2C9* activity, the clearance of the anticoagulant *S*-warfarin was reported to be substantially reduced in patients with end-stage renal disease [43, 48], and the warfarin dose requirements of patients with moderate and severe kidney impairment were significantly lower than those of no kidney disease [43]. However, the impact of renal disease induced *CYP2C9* down-regulation on the clearance of the anti-hyperglycemic tolbutamide is not clear in human, because tolbutamide is almost exclusively eliminated by the kidneys, and is, therefore, contraindicated in patients with severe renal failure [49]. In rats, *CYP2C11* down-regulation was also demonstrated in chronic renal disease; however, no change in hepatic tolbutamide 4-hydroxylation was observed most probably due to the fact that tolbutamide is not selective for *CYP2C11* contrary to the human *CYP2C9* ortholog, but other CYPs are involved in the metabolism in rat [50]. Furthermore, chronic kidney disease resulted in substantial reduction of *CYP3A2* expression and activities (erythromycin *N*-demethylation; 1'- and 4-hydroxylation of midazolam) in rats [50, 51]. In patients with end-stage renal disease, erythromycin *N*-demethylation by *CYP3A4* was also reported to decrease; however, the alteration of erythromycin clearance was not exclusively attributed to the reduced *CYP3A4* activity, but also to the changes in transporter activities (OATPs, P-gp) [44]. Increased systemic exposure of several other *CYP3A4*-substrate drugs, such as tadalafil and solifenacin, was demonstrated in patients with chronic renal impairment [52]. In contrast, the clearance of the *CYP3A4* probe substrate midazolam appeared to be unchanged in kidney disease patients [53]. Regarding hepatic *CYP1A2* expression, complex impact of chronic kidney disease was depicted: (1) human uremic serum significantly decreased the expression and the activity of *CYP1A2* in rat hepatocytes [18]; (2) in rats, mild or negligible effect of renal impairment on *CYP1A2* expression

was observed in vivo [21, 51]; (3) in patients with chronic kidney disease, mild or no changes were observed in clearance of *CYP1A2* substrates, such as duloxetine, lidocaine or tasimelteon [54].

In the present study, the prevalence of patients with low CYP expression was found to be considerably higher in the end-stage kidney disease group than in organ donors. Approximately, one quarters of organ donors expressed CYPs at high concentration; whereas, high CYP expression was scarcely identified in patients with impaired kidney function. As a consequence of reduced drug-metabolizing capacity, altered drug exposure, hence increased risk of overdosing may occur; therefore, the dosing regimen is recommended to be adjusted in patients with chronic kidney disease to avoid adverse drug reactions [47, 55]. The non-renal clearance of drugs, such as duloxetine, erythromycin, ciprofloxacin or warfarin, has been reported to decrease, and reduced dosing is required in patients with severe chronic kidney disease [43–46]. It should be noted that renal replacement therapy can complicate the medication of patients. Kidney transplantation can substantially and stably ameliorate CYP expression and drug-metabolizing capacity; whereas, intermittent dialysis can transiently increase CYP-mediated drug metabolism; however, the duration and the extent of the alteration can be poorly quantified [10, 55].

Some limitations of the clinical part of the present work should be mentioned. First, for comparison of CYP expression in patients with end-stage renal disease, deceased organ donors and not healthy volunteers were enrolled in the healthy control group. However, all the donors were considered to be healthy on the basis of the normal liver and kidney function parameters. For better comparison, further study involving healthy subjects may be required. Second, although direct evidence has previously been provided for the correlation between leukocyte expression and hepatic enzyme activities (as well as hepatic expression) of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A4* [13], it should be validated for patients with end-stage renal disease. Taken liver biopsy sample for CYP expression assays is risky and definitely not allowed to obtain from patients because of ethical issues. Further studies are nevertheless required to provide indirect evidence by obtaining significant correlation between the leukocyte CYP expression in patients and the elimination rate of CYP-selective substrate drugs.

In sum, qPCR technique is considered to be a sensitive and accurate method for gene expression analysis. The refinement of RNA extraction and reverse transcription as well as the development of duplex qPCR assays substantially improved the detection of low-level CYP expression even with low input RNA amounts. Poor CYP expression was expected in leukocytes of patients with end-stage renal disease; however, the expression of *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* and *CYP3A4* was efficiently quantified using the

refined method. The expression of these CYP species was significantly lower in patients with end-stage renal disease than in organ donors with normal kidney function. Our findings provided a direct evidence for transcriptional down-regulation of CYP genes in patients with impaired kidney function that can consequently contribute to the increase of drug exposure. Information on patients' CYP expression in combination with identification of polymorphic CYP alleles may refine the personalized medication, facilitating the appropriate dosage, and can predict the risk of outlying from the therapeutic concentration range.

Acknowledgements Open access funding provided by ELKH Research Centre for Natural Sciences. This work was supported by the grants from the National Research, Development and Innovation Fund (VEKOP-2.3.3-15-2017-00014).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Heaf J. Current trends in European renal epidemiology. *Clin Kidney J.* 2017;10(2):149–53.
2. Kramer A, Pippias M, Noordzij M, Stel VS, Afentakis N, Ambühl PM, et al. The European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry annual report 2015: a summary. *Clin Kidney J.* 2018;11(1):108–22.
3. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 2007;116(1):85–97.
4. Go AS. Cardiovascular disease consequences of CKD. *Semin Nephrol.* 2016;36(4):293–304.
5. Bello AK, Alruhaimi M, Ashuntantang GE, Basnet S, Rotter RC, Douthat WG, et al. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. *Kidney Int Suppl.* 2017;7(2):122–9.
6. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* (2011). 2013;3(1):1–150. https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
7. Rizzo MA, Frediani F, Granata A, Ravasi B, Cusi D, Gallieni M. Neurological complications of hemodialysis: state of the art. *J Nephrol.* 2012;25(2):170–82.
8. Karunaratne K, Taube D, Khalil N, Perry R, Malhotra PA. Neurological complications of renal dialysis and transplantation. *Pract Neurol.* 2018;18(2):115–25.
9. Shafiee MA, Chamanian P, Shaker P, Shahideh Y, Broumand B. The impact of hemodialysis frequency and duration on blood pressure management and quality of life in end-stage renal disease patients. *Healthcare (Basel).* 2017;5(3):52.
10. Momper JD, Venkataraman R, Nolin TD. Nonrenal drug clearance in CKD: searching for the path less traveled. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010;17(5):384–91.
11. Yeung CK, Shen DD, Thummel KE, Himmelfarb J. Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int.* 2014;85(3):522–8.
12. 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.
13. 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.
14. Shah RR, Smith RL. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;79(2):222–40.
15. Ladda MA, Goralski KB. The effects of CKD on cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016;23(2):67–75.
16. Barnes KJ, Rowland A, Polasek TM, Miners JO. Inhibition of human drug-metabolising cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in vitro by uremic toxins. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(9):1097–106.
17. Volpe DA, Tobin GA, Tavakkoli F, Dowling TC, Light PD, Parker RJ. Effect of uremic serum and uremic toxins on drug metabolism in human microsomes. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;68(2):297–303.
18. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, et al. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol.* 2005;144(8):1067–77.
19. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Désy F, Leblond FA, Desbiens K, et al. Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):3041–8.
20. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1258–70.
21. Velenosi TJ, Feere DA, Sohi G, Hardy DB, Urquhart BL. Decreased nuclear receptor activity and epigenetic modulation associates with down-regulation of hepatic drug-metabolizing enzymes in chronic kidney disease. *FASEB J.* 2014;28(12):5388–97.
22. Shah RR, Shah DR. Personalized medicine: is it a pharmacogenetic mirage? *Br J Clin Pharmacol.* 2012;74(4):698–721.
23. 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.
24. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica.* 2020;50(1):9–18.
25. Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, et al. Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochrome P450s and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(1):83–92.
26. Monostory K, Tóth K, Kiss Á, Háfra E, Csikány N, Paulik J, et al. Personalizing calcineurin inhibitor therapy by adjusting to donor

- CYP3A-status in liver transplant patients. *Brit J Clin Pharmacol.* 2015;80(6):1429–37.
27. Tóth K, Búdi T, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Nagy A, et al. Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy. *Per Med.* 2015;12(3):199–207.
28. Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, et al. Optimization of clonazepam therapy adjusted to patient's CYP3A-status and NAT2 genotype. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(12):pyw083.
29. Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, et al. Potential role of patients' CYP3A-status in clozapine pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017;20(7):529–37.
30. Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9306564.
31. Thatcher SA. DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clin Chem.* 2015;61(1):89–99.
32. Tesena P, Korchunjit W, Taylor J, Wongtawan T. Comparison of commercial RNA extraction kits and qPCR master mixes for studying gene expression in small biopsy tissue samples from the equine gastric epithelium. *J Equine Sci.* 2017;28(4):135–41.
33. Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;2010(6):691–3.
34. Shukla S, Jhamtani RC, Dahiya MS, Agarwal R. A novel method to achieve high yield of total RNA from zebrafish for expression studies. *Int J Bioassays.* 2017;6(5):5383–5.
35. Chomczynski P, Wilfinger W, Kennedy A, Rymaszewski M, Mackey K. RNazol® BD: a reagent for the effective isolation of RNA from whole blood. *Nat Methods.* 2013;10:ii.
36. Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE.* 2018;13(5):e0196438.
37. Levesque-Sergerie JP, Duquette M, Thibault C, Delbecchi L, Bissonnette N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2007;8:93.
38. Okello JB, Rodriguez L, Poinar D, Bos K, Okwi AL, Bimenya GS, et al. Quantitative assessment of the sensitivity of various commercial reverse transcriptases based on armored HIV RNA. *PLoS ONE.* 2010;5(11):e13931.
39. Picard-Meyer E, Peytavin de Garam C, Schereffer JL, Marchal C, Robardet E, Cliquet F. Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1. *Biomed Res Int.* 2015;2015:839518.
40. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. *A–Z of quantitative PCR* [chapter 3]. International University Line: La Jolla; 2004. p. 87–112.
41. Yasukawa K, Nemoto D, Inouye K. Comparison of the thermal stabilities of reverse transcriptases from avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukaemia virus. *J Biochem.* 2008;143(2):261–8.
42. Nolin TD, Frye RF, Matzke GR. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003;42(5):906–25.
43. Gasser TC, Ebert SC, Graversen PH, Madsen PO. Ciprofloxacin pharmacokinetics in patients with normal and impaired renal function. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(5):709–12.
44. Limdi NA, Limdi MA, Cavallari L, Anderson AM, Crowley MR, Baird MF, et al. Warfarin dosing in patients with impaired kidney function. *Am J Kidney Dis.* 2010;56(5):823–31.
45. Sun H, Frassetto LA, Huang Y, Benet LZ. Hepatic clearance, but not gut availability, of erythromycin is altered in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(4):465–72.
46. Lobo ED, Heathman M, Kuan HY, Reddy S, O'Brien L, Gonzales C, et al. Effects of varying degrees of renal impairment on the pharmacokinetics of duloxetine: analysis of a single-dose phase I study and pooled steady-state data from phase II/III trials. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(5):311–21.
47. Lea-Henry TN, Carland JE, Stocker SL, Sevastos J, Roberts DM. Clinical pharmacokinetics in kidney disease: fundamental principles. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(7):1085–95.
48. Dreisbach AW, Japa S, Gebrekal AB, Mowry SE, Lertora JJ, Kamath BL, et al. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(5):475–7.
49. Arnouts P, Bolignano D, Nistor I, Bilo H, Gnudi L, Heaf J, et al. Glucose-lowering drugs in patients with chronic kidney disease: a narrative review on pharmacokinetic properties. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1284–300.
50. Velenosi TJ, Fu AY, Luo S, Wang H, Urquhart BL. Down-regulation of hepatic CYP3A and CYP2C mediated metabolism in rats with moderate chronic kidney disease. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(8):1508–14.
51. Leblond F, Guévin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barré M, Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(2):326–32.
52. Zhang Y, Zhang L, Abraham S, Apparaju S, Wu TC, Strong JM, et al. Assessment of the impact of renal impairment on systemic exposure of new molecular entities: evaluation of recent new drug applications. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(3):305–11.
53. Nolin TD, Frye RF, Le P, Sadr H, Naud J, Leblond FA, et al. ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(10):2269–76.
54. Tan ML, Yoshida K, Zhao P, Zhang L, Nolin TD, Piquette-Miller M, et al. Effect of chronic kidney disease on nonrenal elimination pathways: A systematic assessment of CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and OATP. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(5):854–67.
55. Roberts DM, Sevastos J, Carland JE, Stocker SL, Lea-Henry TN. Clinical pharmacokinetics in kidney disease: application to rational design of dosing regimens. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(8):1254–63.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



OPEN

CYP3A-status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients

Máté Déri¹, Zsófia Szakál-Tóth², Ferenc Fekete¹, Katalin Mangó¹, Evelyn Incze¹, Annamária Minus¹, Béla Merkely², Balázs Sax^{2,3} & Katalin Monostory^{1,3}✉

High inter-individual variability in tacrolimus clearance is attributed to genetic polymorphisms of CYP3A enzymes. However, due to CYP3A phenoconversion induced by non-genetic factors, continuous changes in tacrolimus-metabolizing capacity entail frequent dose-refinement for optimal immunosuppression. In heart transplant recipients, the contribution of patients' CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) to tacrolimus blood concentration and dose-requirement was evaluated in the early and late post-operative period. In low CYP3A4 expressers carrying CYP3A5*3/*3, the dose-corrected tacrolimus level was significantly higher than in normal CYP3A4 expressers or in those with CYP3A5*1. Modification of the initial tacrolimus dose was required for all patients: dose reduction by 20% for low CYP3A4 expressers, a 40% increase for normal expressers and a 2.4-fold increase for CYP3A5*1 carriers. The perioperative high-dose corticosteroid therapy was assumed to ameliorate the low initial tacrolimus-metabolizing capacity during the first month. The fluctuation of CYP3A4 expression and tacrolimus blood concentration (C_0/D) was found to be associated with tapering and cessation of corticosteroid in CYP3A5 non-expressers, but not in those carrying CYP3A5*1. Although monitoring of tacrolimus blood concentration cannot be omitted, assaying recipients' CYP3A-status can guide optimization of the initial tacrolimus dose, and can facilitate personalized tacrolimus therapy during steroid withdrawal in the late post-operative period.

Abbreviations

ABCB1	ATP-binding cassette family B1
CYP	Cytochrome P450
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
PCR	Polymerase chain reaction
SNP	Single nucleotide polymorphism
TNF- α	Tumor necrosis factor α

Heart transplantation is an effective treatment option for patients with end-stage heart dysfunction refractory to maximal medical management; however, due to the gap between waiting list and eligible organs, it is available only for a limited number of patients^{1,2}. Improvement in surgical techniques, intensive care and immunosuppression has led to increasing recipient survival^{3,4}. According to the International Society for Heart and Lung Transplantation database, the one-year survival among heart transplant recipients was over 85% (<https://ishlt.org/research-data/registries/ttx-registry/ttx-quarterly-data-report>, access: 22.07.2021), and further efforts are made to minimize the risk of graft dysfunction after transplantation^{3,5}. However, complications in the postoperative

¹Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Magyar tudósok 2, Budapest 1117, Hungary. ²Heart and Vascular Center, Semmelweis University, Városmajor 68, Budapest 1122, Hungary. ³These authors jointly supervised this work: Balázs Sax and Katalin Monostory. ✉email: monostory.katalin@ttk.hu

period, such as acute rejection, infection and renal insufficiency, are still a challenge for clinicians^{6–8}. One of the causes, associated with these conditions is recipients' variability in immunosuppressant pharmacokinetics that also contributes to post-transplant outcome.

Recipients' drug therapy primarily focuses on immunosuppression and control of allograft rejection as well as on prevention of infections and avoidance of adverse effects of immunosuppressants^{8,9}. Intense initial induction therapy with polyclonal or monoclonal antibodies is applied in about half of heart transplantations, in the remaining cases, lifelong maintenance immunosuppressive therapy follows immediately after surgery^{5,10}. The conventional maintenance immunosuppression generally consists of corticosteroids (prednisone, prednisolone or methylprednisolone), calcineurin inhibitors (cyclosporine A or tacrolimus) and antimetabolite drugs (azathioprine, mycophenolate mofetil or mycophenolic acid)^{4,11}. Calcineurin inhibitor therapy is the cornerstone of maintenance immunosuppressive regimens with tacrolimus, the most frequently used agent^{4,12}. Because of the narrow therapeutic range and the large pharmacokinetic variability among individuals, continuous monitoring of tacrolimus blood concentrations is essential for optimal therapeutic efficacy^{12,13}. The non-balanced sub-optimal therapy leads to allograft rejection episodes, whereas supra-optimal therapy can result in nephrotoxicity, neurotoxicity or increased susceptibility to infections. Therefore, any factor that can modulate the blood concentrations of immunosuppressants, particularly of tacrolimus influences the outcome of transplantation^{8,14,15}.

Tacrolimus is a substrate of ABCB1 transporter (ATP-binding cassette family B1) and CYP3A enzymes (cytochrome P450 3A)^{16,17}; therefore, inter-individual variations in tacrolimus pharmacokinetics have been supposed to be associated with genetic variability of ABCB1 efflux transporter and drug metabolizing CYP3A enzymes^{18,19}. Plenty of clinical studies investigated the impact of *ABCB1* functional polymorphisms on tacrolimus exposure in solid organ transplantation; however, clear association between *ABCB1* variants and tacrolimus bioavailability is debated^{12,20,21}. Hepatic and intestinal tacrolimus-metabolizing capacity rather than *ABCB1* polymorphisms appear to influence tacrolimus bioavailability. Genetic polymorphisms of CYP3A enzymes (CYP3A5, CYP3A4), the key catalysts of tacrolimus metabolism, have been proposed to significantly contribute to inter-patient variability in tacrolimus clearance^{12,19,21,22}. The single nucleotide polymorphism in *CYP3A5**3 allele (6986A > G, rs776746), most common in Caucasian populations, results in truncated mRNA and absence of functional CYP3A5 enzyme^{23,24}. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium has recommended *CYP3A5* genotype-guided tacrolimus dosing in order to rapidly achieve optimal blood concentration after initiation of tacrolimus therapy²⁵. Additional genetic variants of *CYP3A4*, such as *CYP3A4**1B and *CYP3A4**22, have also been suggested to be taken into account during prediction of tacrolimus-metabolizing capacity^{12,26,27}. *CYP3A4**1B (-392A > G, rs2740574) appears to contribute to increased transcription of *CYP3A4* gene, and a close link between the wild-type *CYP3A5**1 and *CYP3A4**1B alleles has been reported which makes the relative contribution to tacrolimus metabolism indistinguishable^{28,29}. *CYP3A4**22 (15389C > T, rs35599367) has been proposed to be associated with low *CYP3A4* expression and reduced activity³⁰. However, the substantial inter-individual or even the intra-individual variability is hardly attributed merely to the genetic polymorphisms of CYP3As. The *CYP3A* genotype determines the potential for the expression of functional or non-functional CYP3A enzymes, whereas non-genetic factors, such as co-medication with CYP3A-inducer drugs (e.g. glucocorticoids, rifampicin), can result in phenoconversion that significantly modulates CYP3A expression and tacrolimus clearance^{31,32}. Patients' calcineurin inhibitor metabolizing capacity can be characterized by the CYP3A-status (*CYP3A5* genotype and *CYP3A4* expression). *CYP3A5* genotyping identifies the genetically determined CYP3A5 expressers or non-expressers, and *CYP3A4* expression in leukocytes can estimate reduced or increased hepatic CYP3A4 activities. We have previously demonstrated a strong correlation between *CYP3A4* mRNA expression in leukocytes and hepatic CYP3A4 activities³³. It means that peripheral leukocytes are appropriate biological samples for providing information about CYP3A4 activities of the liver. In liver transplant recipients, we have successfully applied this complex diagnostic system (CYPtest™) and clearly demonstrated that *CYP3A4* expression rates of liver donors combined with *CYP3A5* genotypes influenced blood concentrations of calcineurin inhibitors (tacrolimus, ciclosporin) in recipients³⁴. The recipients with liver grafts from low or high *CYP3A4* expressers or with grafts carrying *CYP3A5**1 required substantial modification of the initial doses. Furthermore, CYP3A-status guided tacrolimus therapy significantly reduced the risk of misdosing induced acute rejection and nephrotoxicity³⁵.

The clinical protocols of immunosuppressive regimens for heart transplant recipients are basically defined by the transplantation centre^{8,36}; however, due to continuous changes of patients' tacrolimus-metabolizing capacity, frequent refinement of dosing is required for balanced and optimal immunosuppression. The initial high-dose corticosteroid therapy is expected to increase CYP3A expression and the rate of tacrolimus metabolism that are abated during tapering and withdrawal of corticosteroids. The major aim of the present study was to investigate the influence of heart transplant patients' CYP3A-status (*CYP3A5* genotype and *CYP3A4* expression) on tacrolimus blood concentration and dose-requirement early after transplantation. Our further goal was to undertake a systematic evaluation of recipients' CYP3A-status and tacrolimus-metabolizing capacity in the post-transplantation period (0–15 months) and to identify corticosteroid co-medication induced alterations that modified tacrolimus pharmacokinetics.

Materials and methods

Patients and study design. Adult, heart transplant patients (N = 232) at the Heart and Vascular Centre, Semmelweis University (Budapest, Hungary) were enrolled in the study. CYPtesting of the recipients and the study protocol were approved by the Committee of Science and Research Ethics, Medical Research Council (2112-2/2017/EKU, 32,911-2/2019/EKU), and the study was performed in accordance with the relevant guidelines and regulations (Act CLIV of 1997 on Health, decree 23/2002 of the Minister of Health of Hungary and the declaration of Helsinki). Each recipient gave the informed consent to participate in the study. Post-trans-

Demographic data	CYP3A testing	CYP3A-status – tacrolimus therapy association
Number of patients	232	163
Age at the time of transplantation (year) ^a	53.1 (19.5; 68.7)	52.6 (19; 68.7)
Gender (male/female)	175/57	128/35
Bodyweight at the time of transplantation (kg) ^a	78 (47; 120)	80 (47; 120)
Primary disease		
Non-ischaemic DCM	101	68
Ischaemic CM	78	57
Congenital heart disease	17	11
Hypertrophic CM	9	8
Restrictive CM	8	5
ARVD	3	2
Idiopathic DCM	3	2
Other	13	10

Table 1. Demographic data of the heart transplant patients. ARVD, arrhythmogenic right ventricular dysplasia; CM, cardiomyopathy; DCM, dilated CM. ^aMedian (min; max).

plant CYP3A-status was determined in 232 recipients, whereas 163 patients were involved in the evaluation of CYP3A-status and post-operative tacrolimus blood concentration or dose-requirement. Of the 232 patients, 14 patients died within the first two weeks after surgery, while 55 patients were treated with strong CYP3A inhibitors (e.g. fluconazole, itraconazole) or were transferred to another healthcare institution shortly after transplantation; therefore, these patients (N = 69) were excluded from the analysis. CYP3A4 expression and tacrolimus blood concentrations were followed in 78 patients in the first 15 months after transplantation. The patients' demographic and clinical data (Table 1) as well as the details of tacrolimus therapy (dosage and pre-dose blood concentrations) were recorded. The post-transplant drug therapy was applied according to the conventional clinical protocol which included immunosuppressants and prophylactic medications, such as antibiotics (sul-famethoxazole-trimethoprim, ciprofloxacin, meropenem) and antiviral drugs (ganciclovir, valganciclovir), antihypertensive agents (lercanidipine, ramipril, perindopril), cholesterol-lowering agent (rosuvastatin), acid-reducing drugs (famotidine, pantoprazole) and if necessary analgesics (paracetamol, ibuprofen). In the late post-operative period, most of these drugs were withdrawn, whereas tacrolimus was applied as a life-long medication.

Immunosuppressive protocol and drug monitoring. The induction immunosuppressive therapy with anti-thymocyte globulin, high-dose corticosteroid (methylprednisolone) and mycophenolate mofetil started immediately after transplantation and lasted up to 4 days. The maintenance regimens consisted of tacrolimus, corticosteroid and mycophenolate mofetil. The initial corticosteroid dose of 250 mg was administered at the time of operation, and the subsequent doses were gradually tapering (125–16–12 mg/day) to a maintenance daily dose of 8 mg by the end of the 3rd week and thereafter. Corticosteroid dose was tapered to a median of 2 mg/day by the end of the first year and was completely withdrawn by the 15th month. Mycophenolate mofetil was applied at the daily dose of 3 g at the early post-operative period, and was tapered to the daily dose of 2 g when tacrolimus reached the therapeutic range (> 10 ng/ml). Tacrolimus therapy was started 5 days after heart transplantation and was administered twice a day. The daily dose was defined as the sum of the morning dose, given after the blood sampling for trough blood concentration (C_0) measurement and the evening dose administered after 12 h later to the morning dose. The initial tacrolimus dose was adjusted to the recipients' bodyweight (0.1 mg/kg) and thereafter controlled by the pre-dose blood concentrations according to the standard clinical protocol. The oral tacrolimus dosage was adjusted to a target therapeutic window in the range of 10–15 ng/ml in the first 6 months, of 8–12 ng/ml in the period of 6–12 months and of 5–10 ng/ml after 12 months.

Therapeutic drug monitoring of tacrolimus was performed routinely (every day in the first week of tacrolimus initiation, every second day from the second week and at least every month from the first month), and the dose was modified if the exposure was out of the target range of tacrolimus blood concentration. The 12 h post-dose trough concentrations of tacrolimus (C_0) were determined in whole blood taken at around 6.00 am before the morning dose was administered. Pre-dose concentrations were calculated by dividing the C_0 by the corresponding 24 h dose on a mg/kg bodyweight basis (C_0/D). The blood concentrations were measured using enzyme immunoassay techniques for tacrolimus (TACR Flex Dimension Dade Behring Inc., Newark, DE) in which free and tacrolimus-bound antibody conjugates were separated using magnetic particles. Tacrolimus-bound antibody conjugates were detected by the β -galactosidase reaction hydrolysing chlorophenol red β -d-galactopyranoside. The assay range for tacrolimus was 1.1–33.6 ng/ml, the intra- and inter-day variability for the quantification was less than 10%. According to the assay description, cross-reactivity with some of the tacrolimus metabolites was detected, and in transplant patients, tacrolimus concentrations approximately 13% higher may be measured by TACR Flex Dimension than by LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) (https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K060502.pdf, access: 04.10.2021).

CYP3A-status of the heart transplant recipients. The CYP3A-status was assayed in peripheral blood of 232 heart transplant recipients. Blood sampling for CYP3A genotyping and for measurement of CYP3A4

expression was performed on the second postoperative day. For those who were involved in tacrolimus follow-up study, CYP3A4 mRNA expression was measured at 1, 3, 6, 12 and 15 months after transplantation. Leukocytes and genomic DNA were isolated from the peripheral blood samples according to the methods described by Temesvári et al.³³. CYP3A5 and CYP3A4 genotyping were carried out by hydrolysis single nucleotide polymorphism (SNP) analysis for CYP3A5*3, CYP3A4*1B and CYP3A4*22 using TaqMan probes (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Germany). The genotypes were distinguished by post-PCR (polymerase chain reaction) allelic discrimination plotting the relative fluorescence values for wild-type and mutant alleles³⁴. For CYP3A4 expression, total RNA was extracted from leukocytes, and RNA (5 µg) was reverse transcribed into single-stranded cDNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time PCR with human cDNA was carried out by using Kapa Probe Fast qPCR Master Kit™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and TaqMan probe and primers specific for CYP3A4 (Eurofins Genomics Germany GmbH). The quantity of CYP3A4 mRNA relative to that of the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was determined. Three categories of CYP3A4 expression were applied to describe low, normal and high expressers. The cut-off values for the CYP3A4 mRNA levels in leukocytes have been previously established on the basis of the cut-off values for the hepatic CYP3A4 activities (nifedipine oxidation or midazolam 1'- and 4-hydroxylation)³³. Low expressers displayed a CYP3A4/GAPDH ratio less than 10⁻⁶, normal expressers a ratio between 10⁻⁶ and 10⁻⁴, whereas in high expressers the ratio was higher than 10⁻⁴. Primer and TaqMan probe sequences for genotyping and mRNA expression measurement are in the supplementary table (Supplementary Table S1).

Data analysis. Linkage disequilibrium between CYP3A5 and CYP3A4 SNPs (rs776746 and rs2740574) was calculated using Haploview (v4.2; Broad Institute, Cambridge, MA)³⁷. The recipients were categorized by their CYP3A-status. The patients carrying at least one CYP3A5*1 allele were considered to be CYP3A5 expressers, while recipients with the CYP3A5*3/*3 genotype were CYP3A5 non-expressers. The CYP3A5 non-expresser recipients were subdivided into three CYP3A4 expresser groups by their CYP3A4 mRNA levels. The blood concentration values of tacrolimus were normalized by the dose and the bodyweight of transplant recipients, and expressed as (ng/ml)/(mg dose/kg bodyweight). The data of normalized blood concentrations (C₀/D) and dose-requirements for the optimal therapeutic level in the recipient groups with various CYP3A-statuses were expressed as the median and mean ± standard deviation (SD). It should be noted that median values generally did not differ much (mostly by 7–10%) from the mean values. Statistical analysis was carried out using GraphPad InStat (v3.05; Graph-Pad Software, San Diego, CA). Between group differences or variations in CYP3A4 mRNA expression and tacrolimus concentration at various time-points after transplantation were calculated by using Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Dunn's multiple comparisons test. A P value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

CYP3A-status of heart transplant recipients. The loss-of-function CYP3A5*3 allele was identified in heart transplant patients, whereas the wild-type CYP3A5*1 was assigned in the absence of CYP3A5*3. Of 232 heart transplant patients, 230 carried one or two CYP3A5*3 alleles (34 patients with CYP3A5*1/*3 and 196 with CYP3A5*3/*3 genotype) (Table 2), displaying allele frequency (91.8%) similar to that in Caucasian white populations (88–97%)³⁸. Two polymorphic CYP3A4 alleles (CYP3A4*1B, CYP3A4*22) that are supposed to influence CYP3A4 expression, were also identified. The majority of heart transplant recipients (more than 85%) carried CYP3A4*1/*1, whereas 13.4% were heterozygous (17 patients carried CYP3A4*1/*1B and 14 displayed CYP3A4*1/*22 genotype). One patient was homozygous for CYP3A4*1B; however, CYP3A4*22/*22 genotype was not detected in the 232 patients. The genetic linkage in the CYP3A locus is well-characterized³⁹, and single nucleotide polymorphisms in CYP3A4*1B and CYP3A5*1 (rs2740574 and rs776746) were found to be in significant linkage in the 232 heart transplant patients (D' 0.758; LOD 9.42). CYP3A4*22 or CYP3A4*1B alleles, assumed to result in reduced and increased expression of CYP3A4, respectively⁴⁰, were identified in 32 patients. However, no association was found between various CYP3A4 genotype groups and CYP3A4 expression probably due to the low frequencies of the polymorphic CYP3A4 alleles (CYP3A4*1B: 4.09%; CYP3A4*22: 3.02%) in the heart transplant recipients and/or to non-genetic factors that masked the effect of genotype on CYP3A4 expression (Supplementary Figure S1). Instead of CYP3A4 genotyping, the patients' hepatic CYP3A4 activities were estimated from CYP3A4 mRNA levels in patients' leukocytes, categorizing the patients into low, normal and high expresser groups (Table 2). CYP3A4 expression assays revealed that more than half of the patients (56%) expressed CYP3A4 at low level, and substantial portion (43.1%) was normal CYP3A4 expressers, whereas only 2 patients (<1%) displayed high CYP3A4 expression early after transplantation (2 days after surgery).

Patients' CYP3A-status and tacrolimus exposure early after transplantation. The association between patients' CYP3A-status and tacrolimus blood concentration 15 days after transplantation was analysed in 163 recipients. On the basis of the post-operative CYP3A-status (CYP3A5 genotypes and CYP3A4 expression in leukocytes), the patients were grouped into two main categories—CYP3A5 expressers (carrying CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*1/*1 genotypes) and non-expressers (with CYP3A5*3/*3)—and the CYP3A5 non-expressers were subdivided into two subgroups: low and normal CYP3A4 expressers. Of the 163 recipients, no patient expressing CYP3A4 at high level was identified. Significant association between the recipients' CYP3A-status and blood concentrations of tacrolimus normalized by the daily dose and the patient's bodyweight was demonstrated (Fig. 1A). The CYP3A5 expresser patients exhibited the lowest tacrolimus blood concentrations (C₀/D), and in CYP3A5 non-expressers, the blood concentrations were significantly higher than in those with functional CYP3A5 enzyme. Tacrolimus blood concentrations in CYP3A5 non-expressers with normal CYP3A4

	N	Frequency (%)	
		Heart transplant patients	Caucasian population ^a
CYP3A5 allele			
*3	426	91.8	88–97
CYP3A4 allele			
*1B	19	4.09	3–5
*22	14	3.02	2.5–8
CYP3A5 genotype			
*1/*1	2	0.86	0–3.4
*1/*3	34	14.7	7.5–17.9
*3/*3	196	84.5	82–92.5
CYP3A4 genotype			
*1/*1	200	86.2	88–93
*1/*1B	17	7.33	6–8
*1B/*1B	1	0.43	0–4
*1/*22	14	6.03	6.6–9.2
*22/*22	–	0.0	0–0.7
CYP3A4 expression			
Low	130	56.0	40.2
Normal	100	43.1	47.3
High	2	0.86	12.5

Table 2. Frequencies of CYP3A alleles, genotypes and CYP3A4 expression in heart transplant patients and in Caucasian population. ^aAllele frequencies in Caucasian population according to³⁸; Genotype frequencies in Caucasian population according to^{22,41,72,73}; CYP3A4 expression frequencies according to³⁵.

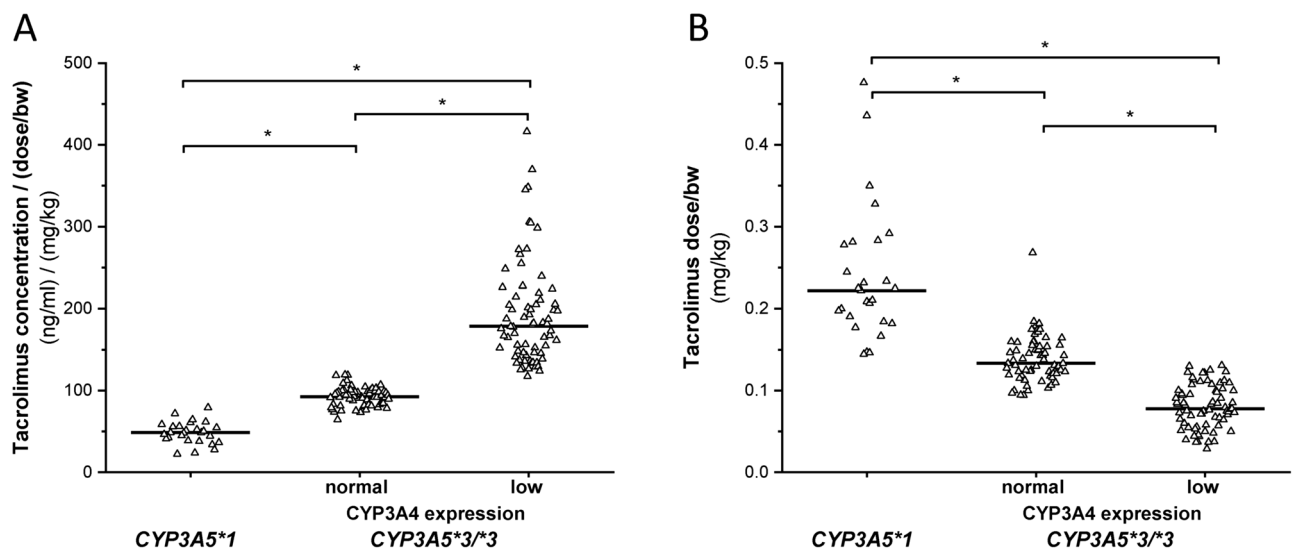


Figure 1. Impact of patients' CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) on the dose-corrected blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients. (A) 12-h post-dose trough concentrations of tacrolimus [(ng/ml)/(mg dose/kg bodyweight)] and (B) dose-requirement for therapeutic blood concentration (mg/kg bodyweight) in the course of patients' CYP3A-status are presented. The lines represent the median values of various CYP3A groups. Normal, Low: CYP3A4 expression levels. * $P < 0.0001$.

mRNA level were approximately twice as high, whereas in those patients expressing CYP3A4 at low level, were about 4-times as high as in CYP3A5 expressers [CYP3A5 expressers: 48.3 ± 13.57 (ng/ml)/(mg/kg bw); normal CYP3A4 expressers: 92.6 ± 11.33 (ng/ml)/(mg/kg bw); low CYP3A4 expressers: 192.5 ± 63.60 (ng/ml)/(mg/kg bw); $N = 163$, $P < 0.0001$].

Tacrolimus dose-requirement for the therapeutic blood concentration window (10–15 ng/ml of pre-dose blood concentration) was significantly associated with the recipients' CYP3A-status. The patients with functional

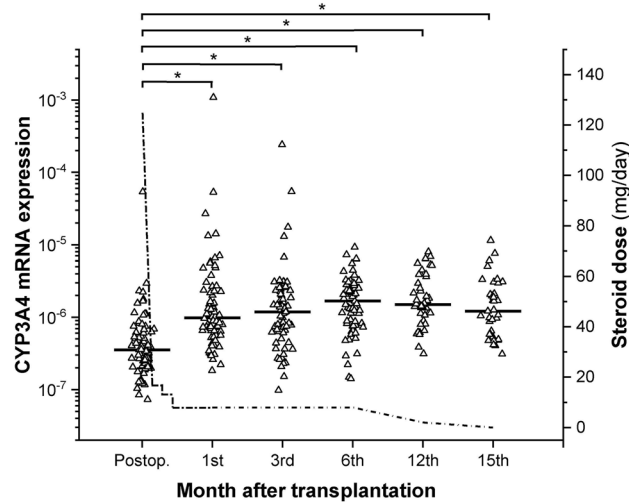


Figure 2. CYP3A4 mRNA expression in heart transplant recipients in a 15-month period after transplantation. The dotted line represents the daily dose of corticosteroid. * $P < 0.0001$.

CYP3A5 enzyme required higher dose of tacrolimus to reach therapeutic blood concentration than the CYP3A5 non-expressers (*CYP3A5*3/*3*) (CYP3A5 expressers: 0.240 ± 0.081 mg/kg bw; normal CYP3A4 expressers: 0.138 ± 0.0283 mg/kg bw; low CYP3A4 expressers: 0.080 ± 0.0266 mg/kg bw; $N = 163$, $P < 0.0001$) (Fig. 1B). Considering the basic clinical protocol for initial tacrolimus dose, the recommended dose of 0.1 mg/kg bw was not optimal for any of the CYP3A-status groups. However, modification of tacrolimus dosage adjusted to the recipients' CYP3A-status would have been appropriate. For the recipients carrying wild-type *CYP3A5*1* allele, markedly increased dose of tacrolimus (2.4-fold) was required for target blood concentration, for normal CYP3A4 expressers carrying *CYP3A5*3/*3*, the dose-requirement was 30–40% higher, whereas for low CYP3A4 expressers, approximately 20% lower dose was more appropriate than the recommended.

Time-course of CYP3A4 mRNA expression and tacrolimus exposure in the first 15 months. The contribution of CYP3A-status (CYP3A4 expression and *CYP3A5* genotype) to tacrolimus exposure was investigated in 78 patients over 15 months after transplantation. In the recipients, CYP3A4 mRNA expression was significantly lower at the time of transplantation (on the second post-operative day) than at any later time points (1, 3, 6, 12 and 15 months) ($P < 0.0001$) (Fig. 2). At the time of transplantation, most of the patients (85%) expressed CYP3A4 at low level predicting to be poor metabolizers; however, more than three orders of magnitude difference were observed between the lowest and the highest CYP3A4 mRNA expression. One and 3 months after transplantation, although wide range of CYP3A4 expression was still observed, more than half of the recipients were intermediate metabolizers. At later time points (6 and 12 months), the CYP3A4 expression range narrowed (1–1.5 orders of magnitude), and 70–85% of the patients were intermediate metabolizers, whereas 15 months after transplantation when methylprednisolone had been withdrawn for at least one month, the proportion of intermediate metabolizers was only 47%. The resultant CYP3A4 expression during the 15-month post-transplant period was assumed to be the consequence of several non-genetic factors, e.g. corticosteroid therapy, one of the most relevant factor; therefore, methylprednisolone doses were displayed in parallel with CYP3A4 mRNA levels (Fig. 2). It should be mentioned that at the post-transplant time points of 12 and 15 months, the CYP3A4 mRNA data were incomplete due to the online control examination instead of personal consultation during COVID-19 pandemic situation.

Since CYP3A5 has a dominant role in tacrolimus metabolism, fluctuation of tacrolimus C_0 concentration per dose/bodyweight was followed separately in CYP3A5 expresser and non-expresser recipients ($N = 13$ and 65, respectively) (Fig. 3). Tacrolimus therapy generally started 5 days after transplantation; therefore, at the first time point, blood sampling for CYP3A4 mRNA measurement did not coincide with the sampling for tacrolimus blood concentration assay. In CYP3A5 non-expressers (with *CYP3A5*3/*3* genotype), some decrease in tacrolimus blood levels normalized by the dose and the bodyweight was observed in the first month after surgery (Fig. 3A); however, it was statistically not significant ($P > 0.05$). Moreover, during the first 6 months, there was no significant differences in tacrolimus C_0 concentration per dose/bodyweight ($P > 0.05$). On the other hand, tacrolimus blood levels 1 year or even 15 months after transplantation significantly increased comparing to those at the early time points (10 days, 1, 3 and 6 months) that were most probably due to the substantial reduction and withdrawal of methylprednisolone therapy (Fig. 3A). In CYP3A5 expressers (with *CYP3A5*1/*3* genotype), no significant differences in tacrolimus blood levels per dose/bodyweight were observed between various time points (Fig. 3B). It should be noted that of the 4 concentration values higher than 125 (ng/ml)/(mg dose/kg bw), 3 values belonged to the same specific patient whose CYP3A4 mRNA expression presented extremely low levels throughout the follow-up study. As this patient displayed very low CYP3A4 expression, he/she was likely to express CYP3A5 at low level as well.

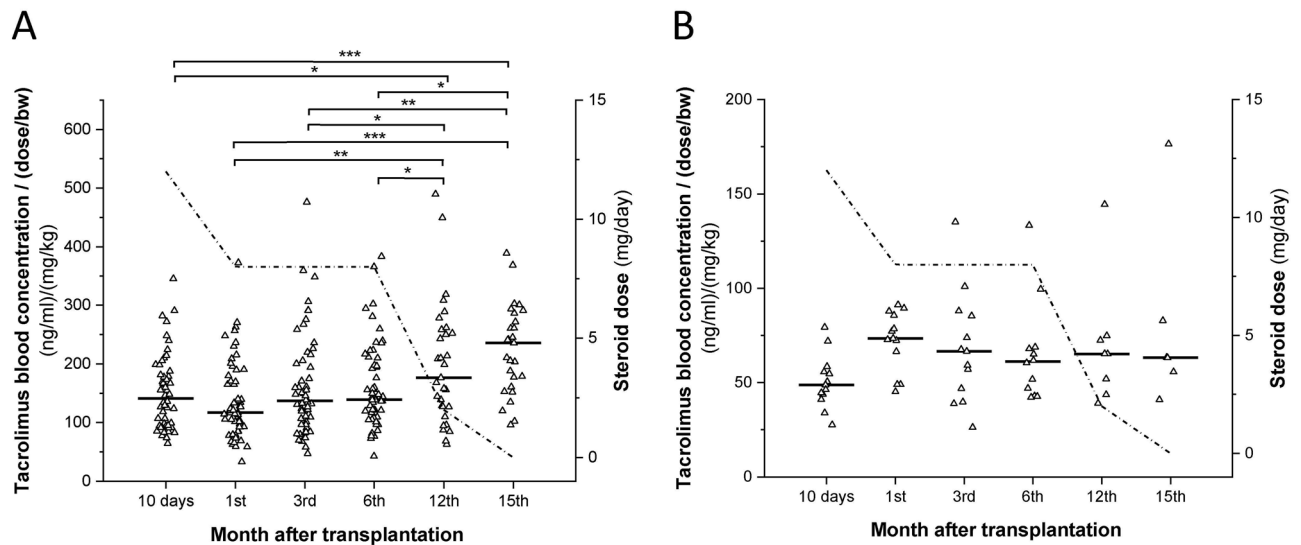


Figure 3. The dose-corrected tacrolimus blood concentrations in heart transplant recipients carrying *CYP3A5*3/*3* genotype (A) and *CYP3A5*1* allele (B) in a 15-month period after transplantation. The dotted line represents the daily dose of corticosteroid. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Discussion

Considering the dominant role of CYP3A5 in tacrolimus metabolism, numerous studies have investigated the association between CYP3A5 genotype and tacrolimus pharmacokinetics in transplant recipients. CYP3A5 expressers with at least one *CYP3A5*1* allele have been reported to require higher tacrolimus doses for achieving therapeutic blood concentration than CYP3A5 non-expresser kidney transplant recipients or patients transplanted with CYP3A5 non-expresser liver grafts^{34,41–43}. In CYP3A5 non-expressers (carrying *CYP3A5*3/*3*), the major catalyst of tacrolimus metabolism is CYP3A4. Plenty of *CYP3A4* variants have been described; however, the clinical relevance of these alleles is sometimes controversial. Amirimani et al. have demonstrated an elevated CYP3A4 transcriptional activity of *CYP3A4*1B* allele; however, the influence of this allelic variant on tacrolimus pharmacokinetics appears to be inconsistent most probably due to the strong genetic linkage with *CYP3A5*1*, the dominant enzyme in tacrolimus metabolism^{44–47}. Although *CYP3A4*22* allele with decreased enzyme activity appears to have an impact on tacrolimus clearance^{42,48}, in the heart transplant patients in the present study, no association was found between the *CYP3A4* genotypes (for *CYP3A4*1B* and *CYP3A4*22* alleles) and CYP3A4 mRNA expression. Due to non-genetic factors, phenoconversion might have masked the influence of genetic variants on CYP3A4 expression.

The postoperative CYP3A4 mRNA expression in heart transplant patients was significantly different from that in the healthy population. The ratio of low, normal and high CYP3A4 expressers considerably varied from the present heart transplant population to the liver donors with healthy liver function in a former study [heart transplant recipients (N = 232): 56%, 43.1%, 0.9% vs liver donors (N = 112): 40.2%, 47.3% 12.5%; Chi-square = 26.031; $P < 0.0001$]³⁵. We assumed that the primary disease or the consequences of the primary disease and the surgical stress as non-genetic factors shifted CYP3A4 expression towards low CYP3A4 mRNA levels. In patients with chronic heart failure, reduction of hepatic drug clearance was attributed to a multi-component mechanism⁴⁹. Although the exact mechanisms have not been revealed, increased hepatic venous pressure and reduced arterial oxygen saturation (hypoxia) as a consequence of weak cardiac output were assumed to induce the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-2 (interleukin 2), IL-4, IL-6 and IFN- γ (interferon γ). Furthermore, ischemia during surgical procedure appears to be accompanied with the release of the pro-inflammatory cytokine TNF- α (tumor necrosis factor α) and IL-6, despite the high-dose corticosteroid treatment at the time of transplantation⁵⁰. These cytokines have been demonstrated to down-regulate the expression and function of CYP3A4 and CYP3A5 both in hepatocytes and in intestinal cells^{51–56}. Furthermore, in renal transplant patients, a transient decrease in tacrolimus clearance was observed 3–4 days after transplantation that was attributed to a temporary increase in serum IL-6 concentration⁵⁶. Although pro-inflammatory cytokine release was not determined in the present heart transplant population, it was reasonable to assume that IL-6 or TNF- α concentrations increased as a consequence of surgical interventions.

The findings of the present study confirmed a significant association between the post-operative tacrolimus blood concentration (C_0/D) and the patients' CYP3A-status (*CYP3A5* genotype and CYP3A4 expression). In accordance with the in vitro and clinical evidences regarding the fact that subjects carrying *CYP3A5*1* allele are extensive tacrolimus-metabolizers^{17,57–59}, the lowest tacrolimus concentrations normalized by the dose and the bodyweight were observed in the heart transplant patients with at least one *CYP3A5*1* allele and consequently expressing functional CYP3A5 enzyme. Of the CYP3A5 non-expressers, the normalized blood concentrations in those patients expressing CYP3A4 at normal level were approximately twofold higher, and in low CYP3A4 expressers were nearly fourfold higher than in the CYP3A5 expresser patients. The relatively low standard deviations both in the CYP3A5 expresser group and in normal CYP3A4 expresser group indicated that in the

patients of each group, the tacrolimus clearance was similar. However, the variation of tacrolimus clearance in the patients expressing CYP3A4 at low level was high. It means that the optimization of the initial tacrolimus therapy in patients with low CYP3A4 expression was a great challenge for clinicians. At the early post-operative time, the average daily dose required for the initial target tacrolimus concentration of 10–15 ng/ml was markedly higher for the CYP3A5 expresser patients than for the non-expressers; furthermore, significant differences in dose-requirement were observed between low and normal CYP3A4 expressers carrying CYP3A5*3/*3 genotype. According to the classical clinical protocol, the initial tacrolimus dose is suggested to be as high as 0.1 mg/kg bodyweight^{4,10}. However, for the recipients with various CYP3A-statuses, the tacrolimus dosing for therapeutic blood concentrations required some modification. A substantial increase (approximately 2.4-fold) of the initial dose was necessary for the CYP3A5 expressers with CYP3A5*1 allele, whereas minor modification was required for low and normal CYP3A4 expressers carrying CYP3A5*3/*3 (20% decrease and 40% increase, respectively). Our results regarding CYP3A5 genotype dependent dose-requirement were in line with the findings in heart transplant recipients in other studies that a substantial increase in tacrolimus daily dose was necessary for the patients carrying CYP3A5*1 allele^{57,58,60,61}. In pediatric heart transplant recipients⁵⁸, the dose-requirement of CYP3A5 expressers was similar to that in the adult recipients in the present study (0.278 and 0.240 mg/kg bodyweight, respectively)⁵⁸. In addition to CYP3A5 genotype, the reduced-function CYP3A4*22 allele as an inheritable factor was proposed to be integrated in pharmacogenetic prediction for personalized tacrolimus therapy²⁷. However, in heart transplant recipients, CYP3A4*22 either alone or in combination with CYP3A5 genotype was considered to provide no additional information beyond CYP3A5 genotype^{61,62}. However, CYP3A4 expression was not assessed in these studies, and no information about tacrolimus-metabolizing capacity was available in CYP3A5 non-expressers, the majority of patients. In a former study involving liver transplant patients, the donors' CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) was demonstrated to be associated with tacrolimus clearance in recipients³⁴. The tacrolimus dosing however had to be modified merely in those recipients transplanted with liver grafts carrying the functional CYP3A5*1 allele and with grafts from low or high CYP3A4 expresser donors (approximately 60% of the liver transplant patients). For those with normal CYP3A4 expresser grafts, the recommended daily tacrolimus dose of 0.1 mg/kg bodyweight was appropriate for therapeutic blood concentration. In contrast, modification of the initial dose was necessary to some extent for all heart transplant patients in the present study.

Several phenoconverting factors (primary disease, surgical intervention, medication) can significantly modulate the expression of CYP3A genes and tacrolimus-metabolizing activity of patients in the early and late post-operative period after transplantation. In the longitudinal follow-up study, marked increase in CYP3A4 expression was observed in the first month after cardiac transplantation. The relatively low CYP3A4 expression at the time of transplantation was attributed to the primary pathological condition and to the surgical stress, and was ameliorated partly as a consequence of corticosteroid treatment. The high starting dose of methylprednisolone (as high as 250–125 mg/day) and the daily dose tapering to 8 mg by the end of the 3rd week were assumed to induce CYP3A4 transcription. Continuous increasing trend in CYP3A4 expression was observed up to 6 months that was maintained by the end of the first year when corticosteroid therapy was generally getting withdrawn. As a consequence of corticosteroid cessation, CYP3A4 expression tended to decrease. In parallel, the maximal tacrolimus-metabolizing capacity was achieved by the first month, whereas corticosteroid withdrawal abated tacrolimus clearance in CYP3A5 non-expresser patients. In those patients carrying functional CYP3A5*1 allele, tapering and cessation of corticosteroid dose however did not alter tacrolimus-metabolizing capacity. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus has been reported in renal transplant recipients, and induction of CYP3A enzymes and the efflux transporter P-glycoprotein was assumed to be the most likely mechanism of the interaction⁶³. As a consequence of corticosteroid tapering and withdrawal, a significant increase in dose-corrected tacrolimus exposure has been demonstrated in CYP3A5 non-expresser kidney transplant patients^{64–66}. However, no or negligible elevation in tacrolimus concentration (C_0/D) was observed in CYP3A5*1 carriers that is consistent with the findings of the present study with heart transplant patients. Methylprednisolone and prednisolone have been reported to transcriptionally induce CYP3A4, but not CYP3A5 expression⁶⁷ that confirmed the differences in corticosteroid dependent tacrolimus elimination between CYP3A5 expressers and non-expressers.

Some limitations of the present study should be considered. First, we did not assess CYP3A5 and CYP3A4 alleles other than CYP3A5*3, CYP3A4*1B and CYP3A4*22; however, the prevalence of other clinically relevant CYP3A alleles in Caucasian populations are extremely low⁶⁸. Second, CYP3A4 mRNA expression clearly indicates the impact of drugs that can modify the transcription of CYP3A4 gene; however, the patients' CYP3A-status does not inform about the interaction with CYP3A4 inhibitors, such as fluconazole or itraconazole. These drugs can significantly decrease CYP3A4 function and tacrolimus clearance, but do not modify CYP3A4 mRNA expression. Third, beyond steroid therapy, some confounding factors, such as age and hematocrit were not taken into account during the interpretation of the results. CYP3A5 expression and activity are constant from early childhood through adulthood, whereas CYP3A4 expression exceeds the adult level by the age of 3 years, decreases to the adult level by puberty and is markedly reduced in elderly patients^{69–71}. The heart transplant recipients were all above 18 at the time of transplantation, and of 232, there were only 8 patients older than 65; therefore, the patients' age might have been considered as a minor or negligible phenoconverting factor. Tacrolimus displays strong binding to red blood cells; therefore, the alteration of haematocrit in the early post-operative period can influence tacrolimus clearance⁶⁹. Although some decrease in dose corrected tacrolimus concentration was recognized during the first month after transplantation, it was attributed to an increase in CYP3A4 expression rather than to any alteration in haematocrit.

In conclusion, the present study involving heart transplant recipients demonstrated a significant association of the patients' CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) with tacrolimus blood concentration normalized by the dose and the bodyweight (C_0/D) as well as with dose-requirement for optimal therapeutic

blood level in the early post-operative period. Modification of the initial tacrolimus dose (0.1 mg/kg bodyweight) was necessary for all recipients. The recipients' CYP3A-status potentially identified the degree of tacrolimus dose modification for avoiding over- or underexposure in the early postoperative period: CYP3A5*1 carriers required a 2.4-fold increase in tacrolimus dose, whereas dose reduction by 20% was appropriate for low CYP3A4 expressers, and a 40% increase in tacrolimus dose was required for normal expressers. Due to the initial high dose and later on the tapering and cessation of corticosteroid, marked increase in CYP3A4 expression by the first month, continuous elevation throughout the first 6 months and some decrease after steroid withdrawal as well as fluctuation of tacrolimus-metabolizing capacity were observed in CYP3A5 non-expresser patients, but not in those carrying CYP3A5*1. Although monitoring of tacrolimus blood concentration cannot be substituted by assaying recipients' CYP3A-status, it can guide optimization of the initial tacrolimus dose and can also facilitate personalized tacrolimus therapy during steroid withdrawal in the late post-operative period.

Received: 28 July 2021; Accepted: 20 October 2021

Published online: 01 November 2021

References

1. Wilhelm, M. J. Long-term outcome following heart transplantation: current perspective. *J. Thorac. Dis.* **7**, 549–551 (2015).
2. Khush, K. K. *et al.* The international thoracic organ transplant registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 37th adult heart transplantation report-2020; focus on deceased donor characteristics. *J. Heart Lung Transplant.* **39**, 1003–1015 (2020).
3. Davis, M. K. & Hunt, S. A. State of the art: cardiac transplantation. *Trends Cardiovasc. Med.* **24**, 341–349 (2014).
4. Kobashigawa, J. & Luu, M. Immunosuppression strategies in heart transplantation. In *Clinical Guide to Heart Transplantation* (ed. Kobashigawa, J.) 109–136 (Springer International Publishing, 2017).
5. Khush, K. K. *et al.* The international thoracic organ transplant registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: donor and recipient size match. *J. Heart Lung Transplant.* **38**, 1056–1066 (2019).
6. Lund, L. H. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report—2014; focus theme: retransplantation. *J. Heart Lung Transplant.* **33**, 996–1008 (2014).
7. Pham, M. X. *et al.* Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1890–1900 (2010).
8. Soderlund, C. & Radegran, G. Immunosuppressive therapies after heart transplantation—the balance between under- and over-immunosuppression. *Transplant. Rev. (Orlando)* **29**, 181–189 (2015).
9. Dandel, M., Lehmkühl, H. B., Knosalla, C. & Hetzer, R. Impact of different long-term maintenance immunosuppressive therapy strategies on patients' outcome after heart transplantation. *Transpl. Immunol.* **23**, 93–103 (2010).
10. Kim, I. C., Youn, J. C. & Kobashigawa, J. A. The past, present and future of heart transplantation. *Korean Circ. J.* **48**, 565–590 (2018).
11. Baraldo, M., Gregoraci, G. & Livi, U. Steroid-free and steroid withdrawal protocols in heart transplantation: the review of literature. *Transpl. Int.* **27**, 515–529 (2014).
12. Brunet, M. *et al.* Therapeutic drug monitoring of tacrolimus-personalized therapy: second consensus report. *Ther. Drug Monit.* **41**, 261–307 (2019).
13. Han, Y. *et al.* Prediction of tacrolimus dosage in the early period after heart transplantation: a population pharmacokinetic approach. *Pharmacogenomics* **20**, 21–35 (2019).
14. Albring, A. *et al.* Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Clin. Transplant.* **29**, 294–300 (2015).
15. Monostory, K. Metabolic drug interactions with immunosuppressants. In *Organ Donation and Transplantation—Current Status and Future Challenges* (ed. Georgios Tsoulfas) 409–440 (IntechOpen, 2018).
16. Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R. & Komano, T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077–6080 (1993).
17. Dai, Y. *et al.* Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 836–847 (2006).
18. Provenzani, A. *et al.* Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J. Gastroenterol.* **19**, 9156–9173 (2013).
19. Hesselink, D. A., Bouamar, R., Elens, L., van Schaik, R. H. & van Gelder, T. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 123–139 (2014).
20. Tron, C. *et al.* Pharmacogenetics of membrane transporters of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin. Pharmacokinet.* **58**, 593–613 (2019).
21. Zhang, X., Lin, G., Tan, L. & Li, J. Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: pharmacogenetic considerations. *Biomed. Pharmacother.* **102**, 107–114 (2018).
22. Saiz-Rodriguez, M. *et al.* Effect of the most relevant CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on the pharmacokinetic parameters of 10 CYP3A substrates. *Biomedicines* **8**, 94 (2020).
23. Kurose, K., Sugiyama, E. & Saito, Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**, 9–54 (2012).
24. Lamba, J. K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G. & Thummel, K. E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **54**, 1271–1294 (2002).
25. Birdwell, K. A. *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* **98**, 19–24 (2015).
26. Werk, A. N. & Cascorbi, I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin. Pharmacol. Ther.* **96**, 340–348 (2014).
27. Elens, L., van Gelder, T., Hesselink, D. A., Haufroid, V. & van Schaik, R. H. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* **14**, 47–62 (2013).
28. Shi, W. L., Tang, H. L. & Zhai, S. D. Effects of the CYP3A4*1B genetic polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult renal transplant recipients: a meta-analysis. *PLoS ONE* **10**(6), e0127995 (2015).
29. Birdwell, K. A. *et al.* The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet. Genomics* **22**, 32–42 (2012).
30. Okubo, M. *et al.* CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 349–354 (2013).
31. Shah, R. R. & Smith, R. L. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 222–240 (2015).

32. Hukkanen, J. Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **5**, 569–585 (2012).
33. Temesvari, M. *et al.* Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 294–305 (2012).
34. Monostory, K. *et al.* Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 1429–1437 (2015).
35. Csikany, N. *et al.* Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant recipients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **87**, 1790–1800 (2021).
36. Schweiger, M. Immunosuppressive therapy after cardiac transplantation. In *Cardiac Transplantation* (ed. Moffatt-Bruce, S.) 3–22 (IntechOpen, 2012).
37. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
38. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103–141 (2013).
39. Dally, H. *et al.* Genotype relationships in the CYP3A locus in Caucasians. *Cancer Lett.* **207**, 95–99 (2004).
40. Tornio, A. & Backman, J. T. Cytochrome P450 in pharmacogenetics: an update. *Adv. Pharmacol.* **83**, 3–32 (2018).
41. Kurzawski, M. *et al.* CYP3A5 and CYP3A4, but not ABCB1 polymorphisms affect tacrolimus dose-adjusted trough concentrations in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics* **15**, 179–188 (2014).
42. Pallet, N. *et al.* Kidney transplant recipients carrying the CYP3A4*22 allelic variant have reduced tacrolimus clearance and often reach supratherapeutic tacrolimus concentrations. *Am. J. Transplant.* **15**, 800–805 (2015).
43. Provenzani, A. *et al.* Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int. J. Mol. Med.* **28**, 1093–1102 (2011).
44. Wang, D., Guo, Y., Wrighton, S. A., Cooke, G. E. & Sadee, W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* **11**, 274–286 (2011).
45. Amirimani, B. *et al.* Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ. Mol. Mutagen.* **42**, 299–305 (2003).
46. Hesselink, D. A. *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**, 245–254 (2003).
47. Gervasini, G. *et al.* Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl. Int.* **25**, 471–480 (2012).
48. Elens, L. *et al.* A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin. Chem.* **57**, 1574–1583 (2011).
49. Zordoky, B. N. & El-Kadi, A. O. Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Curr. Drug Metab.* **9**, 122–128 (2008).
50. Wan, S. *et al.* Steroid administration in heart and heart-lung transplantation: is the timing adequate?. *Ann. Thorac. Surg.* **61**, 674–678 (1996).
51. Mimura, H. *et al.* Effects of cytokines on CYP3A4 expression and reversal of the effects by anti-cytokine agents in the three-dimensionally cultured human hepatoma cell line FLC-4. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **30**, 105–110 (2015).
52. Abdel-Razzak, Z. *et al.* Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* **44**, 707–715 (1993).
53. Dickmann, L. J., Patel, S. K., Rock, D. A., Wienkers, L. C. & Slatter, J. G. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 1415–1422 (2011).
54. Aitken, A. E. & Morgan, E. T. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1687–1693 (2007).
55. Simon, F. *et al.* Impact of interleukin-6 on drug-metabolizing enzymes and transporters in intestinal cells. *AAPS. J.* **22**, 16 (2019).
56. Enokiya, T. *et al.* Temporary decrease in tacrolimus clearance in cytochrome P450 3A5 non-expressors early after living donor kidney transplantation: effect of interleukin 6-induced suppression of the cytochrome P450 3A gene. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **128**, 525–533 (2021).
57. Diaz-Molina, B. *et al.* Effect of CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genotypes as determinants of tacrolimus dose and clinical outcomes after heart transplantation. *Transplant. Proc.* **44**, 2635–2638 (2012).
58. Gijzen, V. *et al.* Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients. *J. Heart Lung Transplant.* **30**, 1352–1359 (2011).
59. Kniepeiss, D. *et al.* The role of CYP3A5 genotypes in dose requirements of tacrolimus and everolimus after heart transplantation. *Clin. Transplant.* **25**, 146–150 (2011).
60. Uno, T. *et al.* Impact of the CYP3A5*1 allele on the pharmacokinetics of tacrolimus in Japanese heart transplant patients. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **43**, 665–673 (2018).
61. Deininger, K. M. *et al.* CYP3A pharmacogenetics and tacrolimus disposition in adult heart transplant recipients. *Clin. Transplant.* **30**, 1074–1081 (2016).
62. Gijzen, V. M. *et al.* CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics* **14**, 1027–1036 (2013).
63. Anglicheau, D. *et al.* Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1889–1896 (2003).
64. de Jonge, H., Vanhove, T., de Loo, H., Verbeke, K. & Kuypers, D. R. Progressive decline in tacrolimus clearance after renal transplantation is partially explained by decreasing CYP3A4 activity and increasing haematocrit. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 548–559 (2015).
65. Stiff, F., van Kuijk, S. M. J., Bekers, O. & Christiaans, M. H. L. Increase in tacrolimus exposure after steroid tapering is influenced by CYP3A5 and pregnane X receptor genetic polymorphisms in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **33**, 1668–1675 (2018).
66. van Duijnhoven, E. M. *et al.* Increase in tacrolimus trough levels after steroid withdrawal. *Transpl. Int.* **16**, 721–725 (2003).
67. Matsunaga, T. *et al.* Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**, 653–657 (2012).
68. Zhou, Y., Ingelman-Sundberg, M. & Lauschke, V. M. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: A meta-analysis of population-scale sequencing projects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, 688–700 (2017).
69. Staatz, C. E. & Tett, S. E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 623–653 (2004).
70. Tanaka, E. In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans. *J. Clin. Pharm. Ther.* **23**, 247–255 (1998).
71. de Wildt, S. N., Tibboel, D. & Leeder, J. S. Drug metabolism for the paediatrician. *Arch. Dis. Child.* **99**, 1137–1142 (2014).
72. Bruckmueller, H. *et al.* Which genetic determinants should be considered for tacrolimus dose optimization in kidney transplantation? A combined analysis of genes affecting the CYP3A locus. *Ther. Drug Monit.* **37**, 288–295 (2015).
73. Plummer, S. J. *et al.* CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**, 928–932 (2003).

Acknowledgements

The authors would like to thank Csilla Csobánné Oláh and Csilla Bernád for their help in collection of patients' data. The present work was supported by the grants of VEKOP-2.3.3-15-2017-00014 (by the European Union and the State of Hungary co-financed by the European Regional Development Fund), EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 (the Higher Education Institutional Excellence Program (FIKP) of the Semmelweis University, for M.D.), NVKP-16-1-2016-0017 (National Heart Program, by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary) and 2020-4.1.1.-TKP2020 (by the Ministry for Innovation and Technology).

Author contributions

Study conception and design: K.M., B.S., B.M.; C.Y.P. genotyping, measurement of C.Y.P. expression: M.D., F.F., K.M., E.I., A.M.; blood sampling: Z.S.-T., clinical data collection: M.D., F.F., Z.S.-T., data analysis and interpretation: M.D., F.F., K.M., B.S.; manuscript drafting: M.D., K.M.. All authors reviewed the manuscript and approved the final version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00942-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.




Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

ORIGINAL ARTICLE

Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant recipients

Nóra Csikány^{1,2} | Ádám Kiss¹ | Máté Déri¹ | Ferenc Fekete¹ |
Annamária Minus¹ | Katalin Tóth¹ | Manna Temesvári¹ | Enikő Sárváry² |
László Bihari² | Zsuzsa Gerlei² | László Kóbori² | Katalin Monostory¹ 

¹Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Budapest, Hungary

²Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Correspondence

Katalin Monostory, Magyar tudósok 2, H-1117 Budapest, Hungary.
Email: monostory.katalin@ttk.hu

Funding information

National Research, Development and Innovation Fund, Grant/Award Number: VEKOP-2.3.3-15-2017-00014

Aims

Donor's CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) can provide prognostic information regarding tacrolimus-metabolizing capacity of the liver graft and initial tacrolimus dosing for therapeutic blood concentrations in liver transplants. The present work prospectively investigated whether CYP3A-status guided tacrolimus therapy has any potential clinical benefit for recipients in the early postoperative period.

Methods: The contribution of preliminary assaying of donor CYP3A-status to the optimization of initial tacrolimus therapy and to the reduction of adverse events (acute rejection, infection, nephrotoxicity) was investigated in 112 liver transplant recipients (CYPtest group) comparing to 101 control patients on tacrolimus concentration guided therapy.

Results: The time for achieving therapeutic tacrolimus concentration was significantly reduced, confirming potential benefit of initial tacrolimus therapy adjusted to donor's CYP3A-status over classical clinical practice of tacrolimus concentration guided treatment (4 vs 8 days, $P < 0.0001$). Acute rejection episodes (3.6 vs 23.8%, $P < 0.0001$) and tacrolimus induced nephrotoxicity (8 vs 27%, $P = 0.0004$) were less frequent in CYPtest group than in control patients, whereas occurrence of infectious disease was not influenced by tacrolimus dosing strategy (3.6 vs 5.9% in CYPtest and control groups, $P > 0.05$). Acute rejection was often accompanied with tacrolimus blood concentrations lower than 10 ng mL^{-1} (20/24 of control and 2/4 of CYPtest patients), while nephrotoxicity was associated with high tacrolimus concentrations ($>20 \text{ ng mL}^{-1}$) in the first week after transplantation (13/27 of control and 2/9 of CYPtest patients).

Conclusion: CYP3A-status guided therapy significantly improved the risk of mis-dosing induced early adverse effects (acute rejection, nephrotoxicity).

KEYWORDS

acute rejection, CYP3A4 expression, CYP3A5 genotype, donor CYP3A-status, infection, liver transplant recipients, nephrotoxicity, tacrolimus

The authors confirm that the PIs for this paper are Katalin Monostory and László Kóbori, and that the PIs had direct clinical responsibility for patients.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. British Journal of Clinical Pharmacology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Pharmacological Society

1 | INTRODUCTION

Liver transplantation is an accepted treatment option for patients with end-stage liver disease. Improvements in surgical techniques, anaesthesiology, intensive care and immunosuppression have led to increasing graft/patient survival, and further efforts are made to minimize the risk of graft dysfunction.^{1–4} Recipients' drug therapy primarily focuses on immunosuppression and control of allograft rejection as well as on prevention of infections and avoidance of adverse effects of immunosuppressants. The cornerstone of maintenance immunosuppressive regimens is calcineurin inhibitor therapy, using tacrolimus, the most prominent agent.^{5,6} Tacrolimus displays a narrow therapeutic range and large pharmacokinetic variability among individuals; therefore, continuous monitoring of blood concentrations is essential for optimal therapeutic efficacy.⁷ Tacrolimus is a substrate of ABCB1 transporter and CYP3A enzymes; therefore, functional polymorphisms of these proteins are suggested to affect tacrolimus bioavailability. However, the association between various single nucleotide polymorphisms of ABCB1 and tacrolimus pharmacokinetics in liver transplantation is debated. Wei-lin et al. demonstrated the importance of polymorphisms of intestinal (recipient) ABCB1,⁸ whereas no appreciable influence of either liver (donor) or intestinal (recipient) ABCB1 genotypes on tacrolimus dose-requirement or concentration/dose ratios was found by other authors.^{9–12} In recipients, tacrolimus exposure appears to depend on the hepatic and intestinal tacrolimus-metabolizing capacity. The crucial enzymes in tacrolimus metabolism are CYP3A enzymes, and variability in CYP3A activities between individuals, from extremely slow to ultrafast is therefore of particular relevance in postoperative drug therapy.¹³ Genetic polymorphisms of CYP3A enzymes can basically contribute to interindividual variations that is further modulated by internal (age, hormonal status, disease) and environmental factors (comedication, nutrition), resulting in a transient switch into poor or extensive metabolizer phenotype due to phenoconversion.^{14,15} More than 100-fold interindividual variability was observed in hepatic CYP3A4 activity¹⁶; however, the clinical relevance of CYP3A4 genetic polymorphisms is considered to be low. The major underlying reason of interindividual variation is the inhibition or transcriptional induction of CYP3A4 due to concomitant drug treatment or environmental factors.¹⁷ In contrast to CYP3A4, CYP3A5 expression is highly polymorphic. The frequency of CYP3A5*3 allele, resulting in the absence of functional CYP3A5 enzyme, is 88–97% in white populations.¹³ Patients carrying functional CYP3A5*1 allele can metabolize tacrolimus at high rates; therefore, in liver transplantation, the association between tacrolimus pharmacokinetics and CYP3A5 genotypes of both the liver (donor) and the intestine (recipient) has been investigated. In full-size liver transplantation, tacrolimus concentration/dose ratios seem to be influenced by the donor CYP3A5 genotype rather than by the recipient in the early (<1 month after transplantation) and late postoperative period (> 1 month)^{9,10,18,19}; however, some authors have suggested that both the donor and the recipient CYP3A5 genotypes are of major

What is already known about this subject

- CYP3A enzymes are the main catalysts of tacrolimus metabolism.
- Donor's CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) provides prognostic information regarding tacrolimus-metabolizing capacity of the liver graft.
- Recipients transplanted with low or high CYP3A4 expresser grafts or with grafts carrying CYP3A5*1 required substantial modification of the initial tacrolimus doses.

What this study adds

- Initial tacrolimus therapy adjusted to donor's CYP3A-status has potential benefit over classical clinical practice of tacrolimus concentration guided treatment.
- CYP3A-status controlled therapeutic strategy facilitates rapid tacrolimus dose-finding in liver transplant recipients.
- CYP3A-status guided therapy improves the risk of mis-dosing induced early adverse effects (acute rejection, nephrotoxicity).

impact on tacrolimus clearance.^{12,20} In living-donor liver transplantation, due to the fact that the grafted liver regenerates its mass and tacrolimus clearance gradually increases with post-transplant time, the pharmacokinetics primarily affected by the intestinal (recipient) CYP3A5 genotype early after transplantation, and by the liver graft or by both the recipient and the donor genotypes at late postoperative time.^{21–25} Conditions as a consequence of non-balanced suboptimal immunosuppressive therapy can lead to allograft rejection episodes, whereas supraoptimal therapy can result in nephrotoxicity or increased susceptibility to infections.^{6,26} One of the causes, associated with these conditions, is tacrolimus-metabolizing capacity of the graft; therefore, any factor that can modulate tacrolimus blood concentrations influences the outcome of transplantation.¹⁷

Drug-metabolizing capacity of the liver graft can be estimated by the evaluation of CYP-status. We have previously described a complex diagnostic system (CYPtest) that estimates hepatic CYP activities and drug-metabolizing capacity by combining CYP genotype and current CYP expression in leukocytes.¹⁶ CYP mRNA levels in leukocytes of those subjects who do not carry loss-of-function or gain-of-function alleles were proven to reflect hepatic CYP activities. CYP3A5 genotyping identifies the genetically determined CYP3A5 expresser or nonexpresser grafts, whereas CYP3A4 expression in donor leukocytes can estimate reduced or increased CYP3A4 activities in liver grafts. In liver transplant patients, it was

clearly demonstrated that CYP3A4 expression rates of donors combined with CYP3A5 genotypes influenced tacrolimus blood concentrations in recipients in the early post-transplant period.²⁷ The recipients with liver grafts from low or high CYP3A4 expressers or with grafts carrying CYP3A5*1 required substantial modification of initial tacrolimus doses. The donor's CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) is capable of identifying the risk of tacrolimus over- or under-exposure, and can provide significant information for appropriate initial dosage in the early period. Our present work aimed to prospectively investigate whether preliminary assaying of CYP3A-status of liver grafts and CYP3A-status guided tacrolimus therapy have potential clinical benefit for recipients (e.g. time for target tacrolimus concentration, hospitalization time), and whether personalized drug therapy can reduce the risk of misdosing induced adverse reactions (rejection episodes, infection, poor kidney function).

2 | METHODS

2.1 | Patients and study design

Adult patients ($n = 226$) who underwent liver transplantation were enrolled in this prospective, randomized-controlled study carried out at the Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University (Budapest, Hungary). Patients ($n = 13$) who were transplanted with a partial liver graft either from deceased or living donors or underwent re-transplantation were excluded from the study. CYPtest of donors and the study protocol were approved by the Hungarian Committee of Science and Ethics. Each recipient gave the informed consent to participate in the study. The patients' demographic and clinical data (Table 1) as well as the details of tacrolimus therapy (dosage and predose blood concentrations) were recorded. Both the donors and the recipients belonged to the Caucasian (white) population. The post-transplant drug therapy except for tacrolimus was applied according to the conventional clinical protocol which included immunosuppressants and anti-inflammatory agents as well as prophylactic medications, such as antibiotics (sulfamethoxazole-trimethoprim, ciprofloxacin, meropenem), antiviral (ganciclovir, valganciclovir) and antifungal drugs (amphotericin B, fluconazole), acid-reducing agents (famotidine, pantoprazole), and, if necessary, analgesics/anaesthetics (propofol).

2.2 | CYP3A-status of the liver grafts

The estimation of CYP3A-status of liver grafts in CYPtest group was assayed in donors' peripheral blood samples obtained at the time of explantation. Genomic DNA and leukocytes were isolated from blood samples according to the methods described by Temesvári et al.¹⁶ CYP3A5 genotyping was carried out by hydrolysis single nucleotide polymorphism analysis for CYP3A5*3 using TaqMan probes (BioSearch Technologies, Novato, CA, USA) as previously described.²⁷

TABLE 1 Recipients' demographic and clinical data

Recipients' data	CYPtest group	Control group
Number	112	101
Sex: male/female (%)	62/50 (55.4%/44.6%)	64/37 (63.4%/36.6%)
Age at the time of transplantation (y)		
Median (range)	50.5 (42, 56)	49 (36, 53)
Bodyweight (kg), median (range)	75.5 (65, 87.6)	76 (65, 84)
Primary liver disease		
1. Acute liver failure		
Drug-induced	-	2 (2.0%)
Mushroom poisoning	-	1 (1%)
Other	1 (0.9%)	2 (2.0%)
2. Chronic liver disease		
Hepatitis C	46 (41.4%)	38 (37.6%)
Hepatitis B	6 (5.4%)	4 (4.0%)
Alcohol-related liver disease	18 (16.1%)	18 (17.8%)
Primary sclerosing cholangitis	16 (14.3%)	9 (8.9%)
Primary biliary cirrhosis	3 (2.7%)	5 (5.0%)
Autoimmune hepatitis	4 (3.6%)	3 (3.0%)
Congenital fibrosis	3 (2.7%)	3 (3.0%)
Cryptogenic cirrhosis	3 (2.7%)	3 (3.0%)
Tumour: hepatocellular carcinoma	4 (3.6%)	2 (2.0%)
Tumour: others	2 (1.8%)	4 (4.0%)
Wilson's disease	1 (0.9%)	7 (6.9%)
Others	5 (4.5%)	-

For CYP3A4 expression, total RNA was extracted from leukocytes, RNA (3 µg) was reverse transcribed into single-stranded cDNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and then real-time polymerase chain reaction with human cDNA was performed using KAPA Probe Fast qPCR Mastermix kit (KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa) and TaqMan probes for CYP3A4 and the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Microsynth AG, Balgach, Switzerland). The quantity of CYP3A4 mRNA relative to that of GAPDH was determined. Three categories of CYP3A4 expression were applied to describe low, normal and high expressers. The cut-off values for the CYP3A4 mRNA levels in leukocytes have been previously established on the basis of the cut-off values for the hepatic CYP3A4 activities (nifedipine oxidation or midazolam 1'- and 4-hydroxylation).¹⁶ Low expressers displayed a CYP3A4/GAPDH ratio $<10^{-6}$, normal expressers a ratio between 10^{-6} and 10^{-4} , and high expressers a ratio $>10^{-4}$.

2.3 | Immunosuppressant therapy and drug monitoring

Tacrolimus therapy was started 6 hours after transplantation and tacrolimus (Prograf, Astellas Pharma) was given twice a day. The daily dose was defined as the sum of the morning dose, given after blood sampling for trough blood concentration measurement, and the evening dose administered after 12 hours. In CYPtest group ($n = 112$), the patients' tacrolimus therapy was guided by the donors' CYP3A-status²⁷: (i) patients transplanted with CYP3A5 expresser grafts carrying CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*1/*1 genotype received 0.2 mg kg⁻¹ bodyweight of tacrolimus; (ii) whereas for those with CYP3A5 non-expresser grafts (CYP3A5*3/*3), tacrolimus therapy was adjusted to the donors' CYP3A4 expression. Normal dose (0.1 mg kg⁻¹ bodyweight) was given to the patients transplanted with grafts expressing CYP3A4 at normal level (10⁻⁶ to 10⁻⁴), reduced dose (0.05 mg kg⁻¹ bodyweight) was administered to the recipients with grafts expressing CYP3A4 at low level (<10⁻⁶), whereas increased dose (0.2 mg kg⁻¹ bodyweight) was targeted in patients with high CYP3A4 expresser liver grafts (>10⁻⁴). In the control group ($n = 101$), the initial tacrolimus dose was adjusted to the recipients' bodyweight (0.1 mg kg⁻¹) and thereafter controlled by the predose tacrolimus blood concentrations (C_0) according to the conventional clinical protocol. Oral tacrolimus dosage was adjusted to a target therapeutic window in the blood concentration range of 10–15 ng mL⁻¹. For control patients, an algorithm of (target C_0 /current C_0) × current dose for calculation of daily tacrolimus dose was applied. The immunosuppressant therapy based on tacrolimus was applied in combination with mycophenolate mofetil and steroid (methylprednisolone). Mycophenolate mofetil was applied at the daily dose of 2 g at the early postoperative period, whereas the initial methylprednisolone dose of 1 g was administered at the time of operation, and the subsequent doses were gradually tapering (500–250–125–32 mg day⁻¹) to a maintenance daily dose of 32 mg in the first week and of 20 mg day⁻¹ thereafter.

The blood samples for drug assay were taken from the patients before the morning dose (C_0 , 12-h postdose trough concentrations), and tacrolimus concentrations were assayed routinely (every day in the first week and every second day from the second week). Tacrolimus doses administered to the control patients were modified if the exposure was out of the target range of 10–15 ng mL⁻¹. The blood concentrations were measured using enzyme immunoassay techniques for tacrolimus (TACR Flex Dimension Dade Behring Inc., Newark, DE). The assay range for tacrolimus was 1.1–33.6 ng mL⁻¹. The intra- and interday variability for the quantification was <10%. Predose concentrations were calculated by dividing the C_0 by the corresponding 24-hour dose on a mg/kg bodyweight basis.

2.4 | Graft function and tacrolimus-related adverse events

The primary endpoint was the time from the initiation of tacrolimus therapy until the first day of at least 3 consecutive days

with tacrolimus C_0 within the target range (time to achieve target C_0). The proportion of patients achieving the target tacrolimus concentration was recorded as well. Furthermore, biochemical parameters for graft function (serum aspartate transaminase, alanine transaminase, γ -glutamyl transferase, alkaline phosphatase, total and direct bilirubin, prothrombin time, albumin) and signs for any tacrolimus-related adverse effects, such as nephrotoxicity, infection and rejection, were recorded. Early graft function abnormalities were diagnosed as initial poor function²⁸ and as primary non-function.^{29,30} Acute kidney injury manifested in deterioration of renal function was defined by an increase in serum blood urea nitrogen and creatinine levels and by a reduction of estimated glomerular filtration rate. Renal impairment due to surgery-related events (in patients having long, complicated surgical procedure with substantial blood loss), hypotension, septic ischaemia (patients with haemodynamic instability associated with an increase in CRP level and a positive blood/urine culture) or hepatorenal syndrome (in patients with pretransplant poor kidney function) was not considered to be tacrolimus induced kidney dysfunction. Apart from these complications, tacrolimus related nephrotoxicity was considered if an initial increase in the serum creatinine level was >0.5 mg/dL above the pretransplant baseline.³¹ For the diagnosis of acute rejection, abnormal liver function parameters (elevation of hepatic enzymes in serum—transaminases, alkaline phosphatase and γ -glutamyl transferase—and/or of serum bilirubin concentration) were always confirmed by histopathological evaluation of liver biopsy samples.³² Banff schema was applied for grading of rejection.³³

2.5 | Statistical analysis

Statistical analysis of biochemical and clinical parameters as well as of tacrolimus blood concentrations was carried out using GraphPad Instat (v3.05, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Parameter distributions were analysed by Kolmogorov–Smirnov test. Between-group differences were calculated by Mann–Whitney U -test. The benefit of donor CYP3A-status guided tacrolimus therapy over the classical dosing was also evaluated by comparing the ratio of patients with therapeutic tacrolimus concentrations and the length of intensive care and hospital stay in CYPtest group with those in control group. The frequencies of early allograft dysfunction and tacrolimus-related adverse events (poor kidney function, infection, rejection episodes) were also compared. The differences between the CYPtest and control groups were calculated by Fisher's exact test. A 2-tailed P -value <0.05 was considered to be statistically significant.

2.6 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the

common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.

3 | RESULTS

3.1 | Potential benefit of assaying donor's CYP3A-status in initial tacrolimus therapy

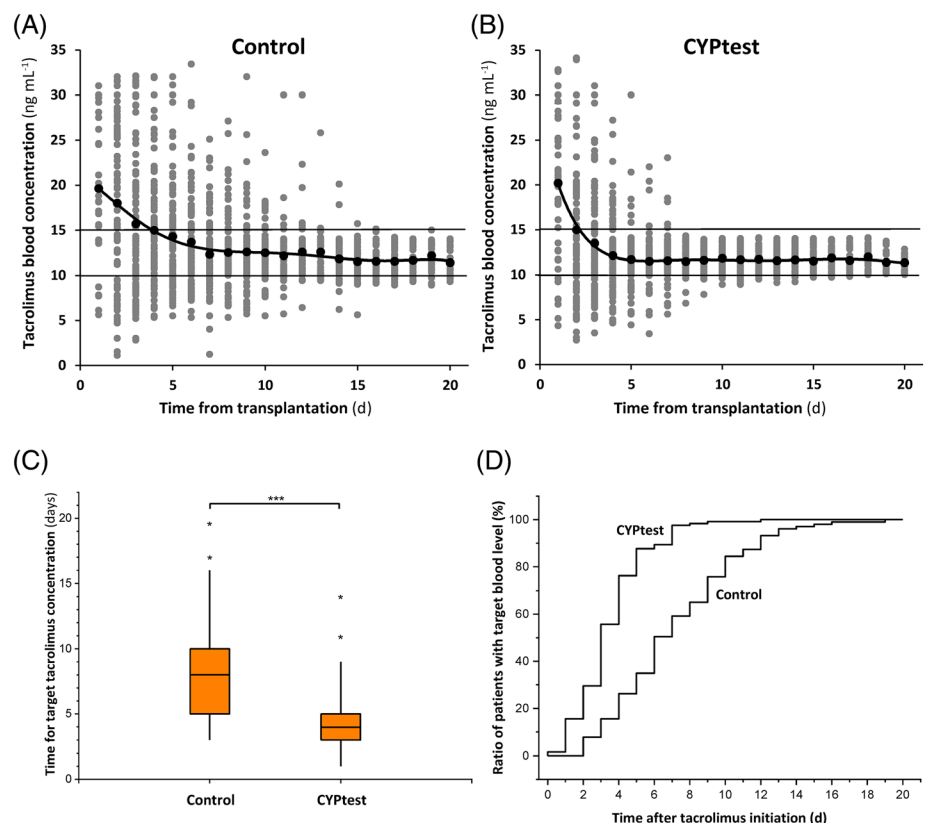
Of 112 donors, 111 carried 1 or 2 CYP3A5*3 alleles (22 donors with CYP3A5*1/*3 and 89 donors with CYP3A5*3/*3 genotype; Table 2), displaying allele frequency (89.3%) similar to that in Caucasian white populations (88–97%).¹³ Liver grafts with wild-type CYP3A5 allele (CYP3A5*1) were considered to be extensive tacrolimus-metabolizers (20.5%) requiring increased tacrolimus dose (0.2 mg kg⁻¹ bodyweight) in recipients,²⁷ whereas CYP3A5 nonexpresser grafts (CYP3A5*3/*3) displayed poor, normal or extensive tacrolimus metabolism depending on their CYP3A4 activities. Hepatic CYP3A4 activities of the CYP3A5 nonexpresser liver grafts were estimated on the basis of CYP3A4

mRNA levels in donors' leukocytes (Table 2). The classical clinical protocol suggests initial tacrolimus dose of 0.1 mg kg⁻¹ bodyweight. However, patients transplanted with liver grafts carrying CYP3A5*3/*3 and expressing CYP3A4 at low level (31.3%) required reduced tacrolimus dose (daily dose of 0.05 mg kg⁻¹ bodyweight), whereas for those recipients who were transplanted with grafts from high CYP3A4 expresser donors (8.9%) increased tacrolimus dose (0.2 mg kg⁻¹ bodyweight) was targeted.²⁷ The tacrolimus blood concentrations in patients of the control and CYPtest groups achieved the target therapeutic range in the 20-day post-transplantation period, although with different rates (Figure 1A and B). Despite the fact that modified initial tacrolimus dose was administered to more than half of the patients (n = 68) in the CYPtest group, the patients' blood concentrations achieved the target therapeutic range (10–15 ng mL⁻¹) much faster than those control recipients who received 0.1 mg kg⁻¹ initial tacrolimus dose and were on blood concentration guided therapy thereafter (CYPtest group: 4.56 ± 2.07 days, 95% CI = 4.198–4.933; control group: 8.33 ± 3.55 days, 95% CI = 7.635–9.019; P < 0.0001; Figure 1C). By the eighth day, most of

TABLE 2 CYP3A-status of the liver grafts in CYPtest group (n = 112)

CYP3A-status		CYP3A4 expression		
		Low expresser	Normal expresser	High expresser
CYP3A5 genotype	*1/*1	1 (0.9%)	-	-
	*1/*3	9 (8.0%)	9 (8.0%)	4 (3.6%)
	*3/*3	35 (31.3%)	44 (39.3%)	10 (8.9%)

FIGURE 1 Tacrolimus blood concentrations in patients on concentration-guided therapy (control) and on donors CYP3A-status guided therapy (CYPtest). Day-by-day tacrolimus C₀ concentrations (individual data and median with trend curve) are presented for all patients in the control (A) and CYPtest (B) groups. The range of 10–15 ng mL⁻¹ indicates the target C₀ range. (C) The time to achieve the target concentration (median, range) in CYPtest group significantly differed from that in control group (***P < 0.0001). (D) The ratios of patients with target tacrolimus concentrations in control and CYPtest groups were compared in the 20-day post-transplant period



the patients (97.5%) in CYPtest group displayed target concentration of tacrolimus, whereas the therapeutic blood concentration was detected merely in 59% of the recipients in the control group (Figure 1D). Tacrolimus is metabolized by both the hepatic and the intestinal CYP3A enzymes; therefore, the combined impact of the donor and the recipient CYP3A5 genotypes on tacrolimus blood concentration was also investigated (Figure 2). The tacrolimus concentration normalized by dose and the bodyweight [$C_0/(\text{dose/bodyweight})$] was significantly lower in patients transplanted with CYP3A5 expresser graft (carrying CYP3A5*1) than in those with CYP3A5 non-expresser graft (CYP3A5*3/*3). However, the recipients' CYP3A5 genotype seemed to have no significant effect on tacrolimus concentration.

3.2 | Clinical benefit of CYP3A-status guided tacrolimus therapy

Biochemical and clinical parameters regarding liver graft and kidney functions as well as adverse reactions (acute rejection and infection episodes) were followed in the first 3 weeks after transplantation (Table 3). All patients were alive in the early postoperative follow-up period. Biochemical parameters indicating liver function quickly returned to normal values both in CYPtest and control groups. The incidence of initial poor function in CYPtest group was similar to that in control group (8.9 and 8.9%, respectively), whereas recipients with primary nonfunction graft did not occur in the groups of the present study. The incidence of initial poor function of the allograft after transplantation was close to the lowest range of previously described incidence data (8.7–24.7%).^{34,35}

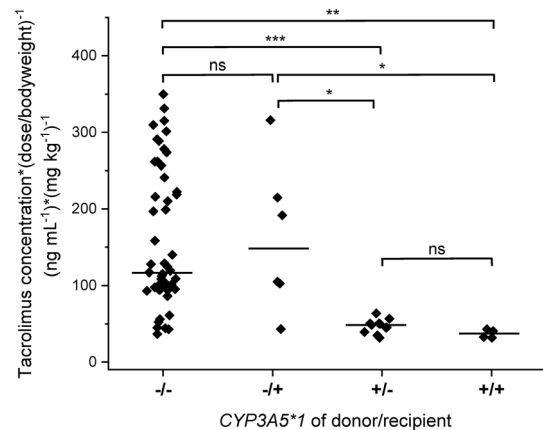


FIGURE 2 Steady-state tacrolimus concentration normalized by the dose and the bodyweight in various CYP3A5 expresser combinations of the donors and the recipients. CYP3A5 nonexpresser: CYP3A5*3/*3; CYP3A5 expresser: CYP3A5*1/*3 or CYP3A5*1/*1; -- donor nonexpresser/recipient nonexpresser; -/+ donor nonexpresser/recipient expresser; +/- donor expresser/recipient nonexpresser; +/+ donor expresser/recipient expresser; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

During the first 3 weeks after transplantation, some adverse events were more frequent in control patients on tacrolimus concentration guided therapy than in the patients on CYP3A-status guided therapy. Infections (bacterial, viral or fungal) and acute rejection are the early complications of inappropriate immunosuppression. Due to the prophylactic drug therapy, infection occurred only in 3.6 and 5.9% of the patients in CYPtest and control groups, respectively; however, the differences in this complication between the 2 groups were found

TABLE 3 Clinical data of liver transplant patients in the early postoperative period

	CYPtest group	Control group	P-value
Time to achieve normal serum concentrations (d) ^a			
AST	3 (2–4)	3 (2–5)	Ns
ALT	4 (2–7)	5 (2–9)	Ns
Prothrombin time	1 (1–2)	1 (1–3)	Ns
Bilirubin	1 (1–3)	1 (1–4)	Ns
Graft function (number of patients)			Ns
Normal	102	92	
Initial poor function	10	9	
Kidney injury (number of patients)			0.0004
Normal kidney function	103	74	
Acute renal impairment	9	27	
Adverse reaction			
Acute rejection	4	24	<0.0001
Infection	4	6	Ns
Intensive care (d) ^a	7 (5–9)	7 (5–10)	Ns
Hospital stay (d) ^a	22 (18–29)	24 (21–32)	0.0174

^aValues are expressed as median (range). AST, serum aspartate transaminase; ALT serum alanine transaminase; Ns, not significant.

to be statistically not significant (Table 3). The incidence of acute rejection confirmed by biopsy was significantly higher in control patients than in CYPtest recipients (23.8 vs 3.6%, OR: 8.4, 95% CI = 2.806–25.241, $P < 0.0001$; Table 3). The patients with a diagnosis of acute rejection mostly displayed tacrolimus blood concentrations under the range of therapeutic level ($<10 \text{ ng mL}^{-1}$) for 2–5 days in the first week (20/24 and 2/4 patients in control and CYPtest groups, respectively). On the basis of tacrolimus concentration normalized by the daily dose and bodyweight, 17 of 24 control patients with acute rejection were most likely to be transplanted with liver grafts from CYP3A5 expresser donors (carrying wild-type *CYP3A5*1* allele) or from CYP3A5 nonexpresser donors expressing CYP3A4 at high level (Figure 3). These recipients generally require higher daily dose of tacrolimus (0.2 mg kg^{-1} bodyweight) than those patients transplanted with grafts from normal or low CYP3A4 expresser donors (0.1 and 0.05 mg kg^{-1} bodyweight, respectively).²⁷ Seven of 24 control patients were presumably transplanted with grafts expressing CYP3A4 at normal level (Figure 3), whereas all CYPtest patients with acute rejection ($n = 4$) were transplanted with grafts assayed to be normal CYP3A4 expressers carrying *CYP3A5*3/*3*.

Tacrolimus-related nephrotoxicity occurred more frequently in control patients than in the CYPtest group (27 vs 8%, OR: 4.18, 95% CI = 1.855–9.401, $P = 0.0004$; Table 3). Since the risk of nephrotoxicity is considered to be high at the tacrolimus trough concentration above $20\text{--}25 \text{ ng mL}^{-1}$,³⁶ the association between impaired renal function and exaggerated tacrolimus blood concentration was investigated. In approximately 50% of the control patients with acute renal impairment (13/27), renal dysfunction was accompanied with exaggerated tacrolimus blood concentrations ($>20 \text{ ng mL}^{-1}$) at least in 2 days of the first week after transplantation. Exaggerated tacrolimus

concentrations in the first postoperative week were also observed in the control patients without renal dysfunction; however, the ratio (10.8%) was significantly less (8/74, $P = 0.0001$). In CYPtest group, tacrolimus blood concentrations $>20 \text{ ng mL}^{-1}$ rarely occurred (5/112), and its prevalence in patients with and without acute renal dysfunction (2/9 and 3/103, respectively) was different from that in control patients (13/27 and 8/74, respectively).

The hospital stay after liver transplant surgery is generally 20–30 days at the Department of Transplantation and Surgery of Semmelweis University (Budapest, Hungary). The length of average hospital stay of recipients on CYP3A-status guided tacrolimus therapy was 22 days which was moderately, but significantly, less than that of the patients on tacrolimus concentration guided therapy (24 days, $P = 0.0174$). However, the length of intensive care was the same (7 days) for patients in CYPtest and control groups.

4 | DISCUSSION

Liver transplantation is considered to be the only efficient, long-term therapeutic solution for patients with end-stage liver disease or acute liver failure. After transplantation, lifelong immunosuppressant therapy with the mainstay calcineurin inhibitor tacrolimus is essential for graft and patient survival. Because of the narrow therapeutic range and wide interindividual pharmacokinetic variability, permanent monitoring of tacrolimus blood concentrations as well as of liver graft function is required for the reduction of drug-related toxicity and early identification of graft injury, and eventually for the improvement of graft/patient survival rates.^{4,6,7} Therefore, in the early postoperative period, the knowledge of tacrolimus-metabolizing capacity of the liver graft can facilitate fast optimization of immunosuppressive therapy resulting in therapeutic tacrolimus concentrations and reducing the risk of over- and underdosing.

The major role of CYP3A5 in tacrolimus clearance and the association between *CYP3A5*1* allele and blood concentration or dose-requirement of tacrolimus in transplant patients were consistently demonstrated.^{7,27,37} The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium provided dosing recommendations based on *CYP3A5* genotype; notably for CYP3A5 expressers, the recommended starting dose was twice as high as the standard dose.³⁸ In CYPtest group of the present study, for the patients transplanted with CYP3A5 expresser grafts (carrying *CYP3A5*1/*3* or *CYP3A5*1/*1*), the initial tacrolimus dosing followed the double-dose strategy to reach the target concentration, in accordance with the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium proposal. Besides the assessment of dose-requirement, genotyping for CYP3A5 was reported to facilitate rapid dose-finding and improved achievement of target tacrolimus concentration in kidney transplant patients.^{39,40} For refining genotype-based tacrolimus dosing, CYP3A4*22 resulting in reduced CYP3A4 expression has recently been suggested to be integrated with CYP3A5 genotype information.^{7,41,42} Nonetheless, variability in tacrolimus dose-requirement appears to be far from that is explainable by *CYP3A5*1* and *CYP3A4*22* ($<20\%$).⁴³ The impact of other CYP3A4

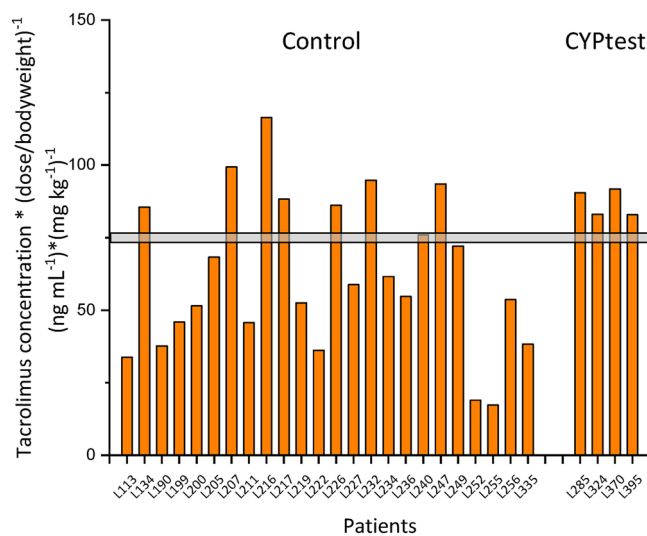


FIGURE 3 Tacrolimus blood concentrations normalized by the dose and the bodyweight in patients with a diagnosis of acute rejection. The horizontal line represents the cut-off tacrolimus levels between the patients assumed (control) or proved (CYPtest) to be transplanted with grafts from CYP3A5 expressers/CYP3A4 high expresser donors and CYP3A4 normal expressers

genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics is, however, disputed, because the nongenetic factors can mask variability in CYP3A4 expression or activity attributed to genetic factors.^{7,37,44,45} The current approach regarding the estimation of hepatic CYP3A4 activity from leukocyte CYP3A4 expression seems to enable an accurate picture of tacrolimus-metabolizing capacity in CYP3A5 non-expressers (with CYP3A5*3/*3).^{16,27} For liver transplant recipients, the donor CYP3A-status (CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression) was demonstrated to provide prognostic information regarding the initial tacrolimus dosing for therapeutic blood concentration.²⁷ In the CYPtest group of the current study, the time for achieving target tacrolimus concentration was significantly reduced, confirming potential benefit of initial tacrolimus therapy adjusted to the donor's CYP3A-status over classical clinical practice of tacrolimus concentration guided treatment (4 days in CYPtest group vs 8 days in control group). Fast individualization of tacrolimus therapy may contribute to amelioration of tacrolimus misdosing induced consequences, such as acute rejection, infections or nephrotoxicity in the early postoperative period, which may have long-term impact on graft function as well as on the overall outcome of liver transplantation.

A number of clinical studies evaluated the impact of intestinal CYP3A5 polymorphism (recipient CYP3A5 genotype) on tacrolimus pharmacokinetics. Several trials involving mainly living donor liver transplant recipients demonstrated important consequences of recipients' CYP3A5 genotype on tacrolimus concentration/dose ratios and on dose requirements in the first postoperative month,^{21,22,24,25} whereas other studies emphasized the contribution of the donor (hepatic) CYP3A5 polymorphism to the variations in tacrolimus dose requirement over recipient (intestinal) CYP3A5 genotype.⁸⁻¹⁰ Our findings confirmed an important role of CYP3A5 expression (the presence of CYP3A5*1 allele) of the liver graft in tacrolimus concentrations normalized by the dose and bodyweight; however, recipients' CYP3A5 genotype was failed to significantly modify dose-adjusted tacrolimus trough levels. Nongenetic factors, such as comedication induced transcription of CYP3A genes or inhibition of CYP3A activity, can transiently alter tacrolimus metabolizing capacity. The steroid methylprednisolone known to induce CYP3A expression and to increase the clearance of calcineurin inhibitors⁴⁶ was administered to the patients at relatively high doses (tapering from 1000 mg of methylprednisolone to 32 mg/d in the first week, 20 mg/d thereafter) in the first postoperative period. Since the same dosing protocol was applied for each patient, we assumed that similar CYP3A induction profiles were developed in the control and CYPtest groups. The antifungal fluconazole is a weak CYP3A inhibitor that may decrease tacrolimus clearance⁴⁷; however, it was applied against fungal infection in 1 patient in the control group and in another patient in the CYPtest group, and no tacrolimus related adverse effect was observed as a consequence of fluconazole coadministration.

Substantial speed-up of reaching target concentration of tacrolimus was not the only benefit of immunosuppressant therapy fine-tuned according to the donor's CYP3A-status. In the present study, significant decrease in acute rejection episodes was observed in the patients on CYP3A-status guided tacrolimus therapy comparing

to the control recipients on tacrolimus blood concentration guided dosing. Acute rejection has been demonstrated to be associated with low predose tacrolimus concentration ($<10 \text{ ng mL}^{-1}$) both in kidney and in liver transplant recipients.^{36,48,49} The fact that subtherapeutic tacrolimus levels were measured in most of the control patients with a diagnosis of acute rejection (83%) in the first week after transplantation highlights the prognostic value of donor CYP3A-status and the importance of assaying tacrolimus-metabolizing capacity of liver grafts. Furthermore, 71% of the control patients with rejection episodes were assumed to be transplanted with liver grafts from CYP3A5 expresser donors or from donors with CYP3A5*3/*3 genotype expressing CYP3A4 at high level. Although the early acute rejection is generally reversible with escalation of immunosuppression or with high-dose steroid pulse therapy, and does not influence long-term graft or/and patient survival,^{32,50,51} most of these rejection episodes with transient graft dysfunction are avoidable with preliminary assaying of donor's CYP3A-status contributing to the fast recovery of patients. It should be mentioned that 2 of the 4 patients with rejection in CYPtest group displayed low tacrolimus concentrations ($<10 \text{ ng mL}^{-1}$) in the first week after transplantation despite the fact that they were normal CYP3A4 expressers carrying CYP3A5*3/*3. This suggests that even if the donor CYP3A-status guided therapy improves the individualization of tacrolimus treatment, careful monitoring of tacrolimus blood concentration is an important tool for reducing the incidence of adverse events.

The most frequent adverse effect of calcineurin inhibitors is nephrotoxicity often called as the *Achilles heel* of transplantation.⁵²⁻⁵⁴ Although the nephrotoxicity potential of tacrolimus is lower than that of ciclosporin, inappropriate dosing of tacrolimus can also induce kidney injury.^{55,56} In the early post-transplant period, acute renal impairment is associated with high mortality⁵⁷; therefore, reduction of the potential risk factors evoking renal injury is essential. The incidence of acute renal failure in the early post-transplant period is higher than 40%, and the calcineurin inhibitor induced kidney injury can compromise long-term survival of liver transplant recipients.⁵⁷⁻⁵⁹ Although total calcineurin inhibitor-free immunosuppressive therapy seems to be hardly acceptable for liver transplant patients, because of insufficient immunosuppression and high rates of acute, steroid-resistant rejection,^{52,60} CYP3A-status guided tacrolimus therapy might be an appropriate solution for reduction of tacrolimus induced nephrotoxicity in the early postoperative period. In the CYPtest group on tacrolimus therapy adjusted to the donor's CYP3A-status, tacrolimus associated acute kidney injury was less frequent than in control patients on tacrolimus concentration guided treatment. Furthermore, in control patients, exaggerated tacrolimus concentrations ($>20 \text{ ng mL}^{-1}$) in the first postoperative week were frequently accompanied with acute renal injury. It was clearly demonstrated that the donor's CYP3A-status influenced the systemic tacrolimus exposure of recipients; however, it can be issued that the additional effect of recipient's CYP3A activity on tacrolimus nephrotoxicity may be attributed to the intrarenal metabolism and local exposure rather than the consequence of systemic tacrolimus concentration. Although significant correlation has been previously demonstrated between increasing risk of nephrotoxicity and

increasing systemic exposure to tacrolimus (predose concentration),³⁶ it is a limitation of the present study that the only information of renal tacrolimus metabolism was the recipient's CYP3A5 genotype, and no CYP3A4 expression data were available.

In the early post-transplant period, infections are common complications associated with immunosuppressive therapy^{7,61}; however, appropriate prophylactic drug therapy (antibacterial, antiviral and antifungal) can successfully reduce the infection episodes. For prevention of graft rejection, increased tacrolimus doses are generally recommended that were proved to increase the susceptibility to infectious diseases.⁶² The donor CYP3A-status controlled tacrolimus therapy, however, did not ameliorate the risk of infection episodes in the present study, which may be explained by risk factors other than immunosuppression, e.g. prolonged ventilation and intensive care stay.

In conclusion, donor CYP3A-status, taking CYP3A5 genotype and CYP3A4 expression into account, can provide information on tacrolimus-metabolizing capacity of liver graft that can contribute to rapid optimization of tacrolimus therapy in the early postoperative period. However, it should be emphasized that CYP3A-assaying is an additional tool for rapid dose-finding and lowering the number of attempts of dose adaptation, and cannot replace careful monitoring of therapeutic tacrolimus concentrations. Furthermore, CYP3A-status controlled treatment of recipients significantly improved misdosing associated acute rejection and nephrotoxicity that may contribute to the avoidance of some late complications. Incorporating tailored initial tacrolimus therapy adjusted to the donor's CYP3A-status into the routine clinical practice can improve recipients' recovery and can ameliorate graft and patient survival.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Maria Mérey for the access to patients' data at the Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University (Budapest, Hungary) and Tamás Micsik and Dorottya Csernus-Horváth for providing recipients' samples. This work was supported by a grant from the National Research, Development and Innovation Fund (VEKOP-2.3.3-15-2017-00014).

COMPETING INTERESTS

There are no competing interests to declare.

CONTRIBUTORS

N.C. collecting patients' clinical data, manuscript writing. Á.K. CYP3A5 genotyping of donors. M.D. contributed new analytical tools. F.F. assaying CYP3A4 expression. A.M. isolation of DNA from recipient samples. K.T. collecting blood samples, isolation of DNA and RNA from donor leukocytes. M.T. collecting patient clinical data. E.S. measuring blood levels of tacrolimus. L.B. patient care. Z.G. patient care. L. K. research design, coordination of the clinical part. K.M. research design, coordination of CYPtest and other laboratory testing, interpretation of data, manuscript writing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data supporting the findings of the present study are not publicly available; however on reasonable request, the data are available from the corresponding author.

ORCID

Katalin Monostory  <https://orcid.org/0000-0002-0861-1450>

REFERENCES

1. Dutkowski P, Linecker M, DeOliveira ML, Müllhaupt B, Clavien PA. Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes. *Gastroenterology*. 2015;148(2):307-323.
2. Adam R, Karam V, Cailliez V, O Grady JG, et al. 2018 annual report of the European liver transplant registry (ELTR) - 50-year evolution of liver transplantation. *Transpl Int*. 2018;31(12):1293-1317.
3. Wiseman AC. Immunosuppressive medications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(2):332-343.
4. Wong TC, Lo CM, Fung JY. Emerging drugs for prevention of T-cell mediated rejection in liver and kidney transplantation. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2017;22(2):123-136.
5. Hussaini T, Erb S, Yoshida EM. Immunosuppressive pharmacotherapy in liver transplantation. *AME Med J*. 2018;3:18.
6. Moini M, Schilsky ML, Tichy EM. Review on immunosuppression in liver transplantation. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1355-1368.
7. Brunet M, van Gelder T, Åsberg A, et al. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus-personalized therapy: second consensus report. *Ther Drug Monit*. 2019;41(3):261-307.
8. Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, et al. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl*. 2006;12(5):775-780.
9. Li D, Zhu JY, Gao J, Wang X, Lou YQ, Zhang GL. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cytochrome P450 3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):133-139.
10. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, et al. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int J Mol Med*. 2011;28(6):1093-1102.
11. Yee ML, Tan HH, Sia WJ, Yau WP. Influences of donor and recipient gene polymorphisms on tacrolimus dosing and pharmacokinetics in Asian liver transplant patients. *Open J Organ Transplant Surgery*. 2013; 3:53-61.
12. Collier JK, Ramachandran J, John L, Tuke J, Wigg A, Doogue M. The impact of liver transplant recipient and donor genetic variability on tacrolimus exposure and transplant outcome. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(9):2170-2175.
13. 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):103-141.
14. Tamási V, Vereczkey L, Falus A, Monostory K. Some aspects of inter-individual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflamm Res*. 2003;52(8):323-333.
15. Shah RR, Smith RL. Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;79(2):222-240.
16. 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.
17. Monostory K. Metabolic drug-interactions with immunosuppressants. In: Tsoulfas G, ed. ISBN 978-1-78923-341-4 *Organ Donation and*

- Transplantation - Current Status and Future Challenges*. London: InTechOpen; 2018:409-440.
18. Yu S, Wu L, Jin J, et al. Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation. *Transplantation*. 2006;81(1):46-51.
 19. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, et al. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients. *Ann Transplant*. 2009;14(1):23-31.
 20. Hendijani F, Azarpira N, Kaviani M. Effect of CYP3A5*1 expression on tacrolimus required dose after liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Clin Transplant*. 2018;32(8):e13306.
 21. Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y, Inui K. Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(2):119-127.
 22. Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(5):413-423.
 23. Muraki Y, Usui M, Isaji S, et al. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant*. 2011;16(4):55-62.
 24. Ji E, Choi L, Suh KS, Cho JY, Han N, Oh JM. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012;94(8):866-872.
 25. Itohara K, Yano I, Tsuzuki T, et al. Matsubara K. a minimal physiologically-based pharmacokinetic model for tacrolimus in living-donor liver transplantation: perspectives related to liver regeneration and the cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) genotype. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2019;8(8):587-595.
 26. Choudhary NS, Saigal S, Shukla R, Kotecha H, Saraf N, Sooin AS. Current status of immunosuppression in liver transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3(2):150-158.
 27. Monostory K, Tóth K, Kiss Á, et al. Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(6):1429-1437.
 28. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl*. 2010;16(8):943-949.
 29. *Organ Procurement and Transplantation Network Policies: Allocation of Livers and Liver-Intestines*, 2020. https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1200/optn_policies.pdf Accessed May 8, 2020.
 30. Davis EG, Florman SS. Primary non-function. In: Ahmad J, Friedman SL, Dancygier H, eds. *Mount Sinai Expert Guides: Hepatology*. John Wiley & Sons: New York; 2014:462-468.
 31. Barri YM, Sanchez EQ, Jennings LW, et al. Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome. *Liver Transpl*. 2009;15(5):475-483.
 32. Choudhary NS, Saigal S, Bansal RK, Saraf N, Gautam D, Sooin AS. Acute and chronic rejection after liver transplantation: what a clinician needs to know. *J Clin Exp Hepatol*. 2017;7(4):358-366.
 33. Ormonde DG, de Boer WB, Kierath A, et al. Banff schema for grading liver allograft rejection: utility in clinical practice. *Liver Transpl Surg*. 1999;5(4):261-268.
 34. Pokorny H, Gruenberger T, Soliman T, Rockenschaub S, Längle F, Steininger R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. *Transpl Int*. 2000;13(Suppl 1):S154-S157.
 35. Bolondi G, Mocchegiani F, Montalti R, Nicolini D, Vivarelli M, De Pietri L. Predictive factors of short term outcome after liver transplantation: a review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(26):5936-5949.
 36. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2001;41(5):542-551.
 37. Hesselink DA, Bouamar R, Elens L, van Schaik RH, van Gelder T. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(2):123-139.
 38. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, et al. Clinical Pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2015;98(1):19-24.
 39. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(6):721-726.
 40. De Meyer M, Haufroid V, Kanaan N, et al. Pharmacogenetic-based strategy using de novo tacrolimus once daily after kidney transplantation: prospective pilot study. *Pharmacogenomics*. 2016;17(9):1019-1027.
 41. Elens L, Haufroid V. Genotype-based tacrolimus dosing guidelines: with or without CYP3A4*22? *Pharmacogenomics*. 2017;18(16):1473-1480.
 42. Abdel-Kahaar E, Winter S, Tremmel R, et al. The impact of CYP3A4*22 on tacrolimus pharmacokinetics and outcome in clinical practice at a single kidney transplant center. *Front Genet*. 2019;10:871.
 43. Bruckmueller H, Werk AN, Renders L, et al. Which genetic determinants should be considered for tacrolimus dose optimization in kidney transplantation? A combined analysis of genes affecting the CYP3A locus. *Ther Drug Monit*. 2015;37(3):288-295.
 44. Provenzani A, Santeusano A, Mathis E, et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol*. 2013;19(48):9156-9173.
 45. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;96(3):340-348.
 46. Yee GC, McGuire TR. Pharmacokinetic drug interactions with cyclosporin (part II). *Clin Pharmacokinet*. 1990;19(5):400-415.
 47. Zhang S, Pillai VC, Mada SR, Strom S, Venkataramanan R. Effect of voriconazole and other azole antifungal agents on CYP3A activity and metabolism of tacrolimus in human liver microsomes. *Xenobiotica*. 2012;42(5):409-416.
 48. Staatz C, Taylor P, Tett S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(9):1905-1909.
 49. Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther*. 2006;112(1):184-198.
 50. Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. *J Int Med Res*. 2018;46(9):3979-3990.
 51. Charlton M, Levitsky J, Aqel B, et al. International liver transplantation society consensus statement on immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2018;102(5):727-743.
 52. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):481-508.
 53. Pallet N, Legendre C. Deciphering calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a pharmacological approach. *Pharmacogenomics*. 2010;11(10):1491-1501.
 54. Castroagudín JF, Molina E, Varo E. Calcineurin inhibitors in liver transplantation: to be or not to be. *Transplant Proc*. 2011;43(6):2220-2223.
 55. Lucey MR, Abdelmalek MF, Gagliardi R, et al. A comparison of tacrolimus and cyclosporine in liver transplantation: effects on renal function and cardiovascular risk status. *Am J Transplant*. 2005;5(5):1111-1119.

56. Nankivell BJ, P'Ng CH, O'Connell PJ, Chapman JR. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity through the lens of longitudinal histology: comparison of cyclosporine and tacrolimus eras. *Transplantation*. 2016;100(8):1723-1731.
57. Ojo AO. Renal disease in recipients of nonrenal solid organ transplantation. *Semin Nephrol*. 2007;27(4):498-507.
58. Zhu M, Li Y, Xia Q, et al. Strong impact of acute kidney injury on survival after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2010;42(9):3634-3638.
59. Chaney A. Primary care management of the liver transplant patient. *Nurse Pract*. 2014;39:26-33.
60. Zhang W, Fung J. Limitations of current liver transplant immunosuppressive regimens: renal considerations. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2017;16(1):27-32.
61. van Hoek B, de Rooij BJ, Verspaget HW. Risk factors for infection after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):61-72.
62. Nacif LS, David AI, Pinheiro RS, et al. An analysis of tacrolimus-related complications in the first 30 days after liver transplantation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(11):745-749.

How to cite this article: Csikány N, Kiss Á, Déri M, et al. Clinical significance of personalized tacrolimus dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;1-11. <https://doi.org/10.1111/bcp.14566>