

**SEMMELWEIS EGYETEM  
DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2970.**

**VARGA KATALIN SZILVIA**

**Experimentális és klinikai farmakológia  
című program**

Programvezető: Dr. Szökő Éva, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Monostory Katalin, tudományos főmunkatárs

**A *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslés és  
alkalmazhatósága ciklofoszfamiddal kezelt  
neuroblasztóma betegeknél**

**Doktori Értekezés**

**Varga Katalin Szilvia**

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Monostory Katalin, D.Sc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Tamási Viola, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Szeltner Zoltán, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság elnöke:

Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár

Komplex vizsga szakmai bizottság tagjai:

Dr. Szatmári István, Ph.D., vegyészmérnök

Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2023

# Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék .....	5
1 Bevezetés .....	6
1.1 Neuroblasztóma megbetegedés általános ismertetése .....	6
1.1.1 Epidemiológia.....	6
1.1.2 Etiológia .....	6
1.1.3 Diagnózis, klinikai megjelenés.....	7
1.1.4 Patológia, tumorgenetika .....	8
1.1.5 A neuroblasztóma megbetegedés terápiája.....	8
1.2 Gyógyszer-metabolizmus .....	10
1.2.1 Gyógyszer biotranszformáció általános folyamata.....	10
1.2.2 A CYP enzimek általános ismertetése.....	12
1.2.3 CYP enzimaktivitást, kifejeződést befolyásoló genetikai tényezők.....	15
1.2.4 CYP enzimaktivitást, kifejeződést befolyásoló nem-genetikai tényezők - a fenokonverzió jelensége .....	16
1.2.5 A ciklofoszfamid metabolizmusában jelentős CYP izoenzimek.....	20
1.2.5.1 CYP2B6.....	20
1.2.5.1.1 A CYP2B6 polimorf allélvariánsai.....	21
1.2.5.1.2 A CYP2B6 fenokonverziója.....	24
1.2.5.2 CYP2C19.....	25
1.3 A ciklofoszfamid .....	27
1.3.1 A vegyület általános jellemzői, felhasználási területe.....	27
1.3.2 Hatásmechanizmus .....	27
1.3.3 A ciklofoszfamid metabolizmusa és az eliminációs útvonalakhoz köthető rezisztencia mechanizmusok .....	28
1.3.4 A ciklofoszfamid terápia hatékonysága, toxikus szövődményei és a rezisztencia kialakulása .....	30

2	Célkitűzések .....	33
3	Anyagok és módszerek .....	35
3.1	Májszövet donorok és betegek .....	35
3.2	Neuroblasztómával kezelt betegek terápiája .....	35
3.3	Májszövet minták CYP2B6 fenotípusának jellemzése.....	36
3.3.1	Mikroszóma preparálás.....	36
3.3.2	CYP2B6-szelektív aktivitás meghatározása.....	36
3.3.3	CYP2B6 mRNS expresszió meghatározása .....	37
3.4	CYP haplotípus és genotípus meghatározás.....	38
3.5	Adatok értékelése .....	39
4	Eredmények.....	41
4.1	A CYP2B6 fenotípus kialakításában potenciálisan jelentős genetikai és nem-genetikai tényezők .....	41
4.1.1	g.18053A>G (rs2279343) SNV meghatározása: PCR alapú módszerfejlesztés.....	41
4.1.2	A májszövet donorok <i>CYP2B6</i> genotípusa.....	43
4.1.3	A májszövet minták CYP2B6 <i>S</i> -mefenitoin <i>N</i> -demetiláz aktivitása és mRNS expressziója .....	45
4.1.4	A CYP2B6 fenotípust meghatározó genetikai és nem-genetikai tényezők	46
4.2	Neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek <i>CYP2B6</i> genotípusa és a ciklofoszfamid kezelésük közötti lehetséges összefüggések vizsgálata.....	55
4.2.1	A betegek <i>CYP2B6</i> és <i>CYP2C19</i> genotípusa .....	55
4.2.2	A ciklofoszfamid terápiát követő toxikus mellékhatások megjelenése neuroblasztóma betegeknél.....	57
4.2.3	A ciklofoszfamid kezelés kimenetele a betegek <i>CYP2B6</i> és <i>CYP2C19</i> genotípusa függvényében .....	64
5	Eredmények értékelése .....	67
5.1	A <i>CYP2B6</i> genetikai variabilitás, illetve az egyén-függő és környezeti nem-genetikai faktorok hozzájárulása a máj CYP2B6 fenotípusához.....	68
5.2	A <i>CYP2B6</i> genetikai variabilitás és a ciklofoszfamid terápia összefüggései neuroblasztómával kezelt gyermekeknél.....	74

6	Következtetések.....	81
7	Összefoglalás .....	84
8	Summary.....	85
9	Irodalomjegyzék .....	86
10	Saját publikációk jegyzéke .....	118
10.1	Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke .....	118
10.2	Disszertációtól független publikációk jegyzéke .....	118
11	Köszönetnyilvánítás .....	120
12	Függelék .....	121

## **Rövidítésjegyzék**

AhR: aromás szénhidrogén receptor

ALDH: aldehid dehidrogenáz enzim

CAR: „*constitutive androstane*” receptor

CPIC: *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CYP: citokróm P450 enzim

CYP2B7P: CYP2B7 pszeudogén

CTC: *Common Toxicity Criteria*

EM: fokozott metabolizáló

GGT: szérum gamma-glutamil-transzferáz

GPT: szérum alanin-aminotranszferáz

GR: glükokortikoid receptor

GST: glutation-S-transzferáz

IL-6: interleukin-6 citokin

IM: intermediér metabolizáló

MYCN: *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*

NADPH:  $\alpha$ -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PCR: polimeráz láncreakció

PharmVar: *Pharmacogene Variation Consortium*

PM: gyenge metabolizáló

PXR: „*pregnane*” X receptor

SNV: egybázist érintő variáns

# **1 Bevezetés**

A gyógyszeres terápia alkalmazása nélkülözhetetlen korunk betegségeinek, így daganatos betegségek kezelésében is. A gyógyszeres terápiára adott válasz egyénenként nagymértékben különbözhet, a kedvező kimenetel mellett elégtelen terápiás válasz vagy toxikus, akár fatális kimenetelű mellékhatások is kialakulhatnak. Az eltérések hátterében gyakran a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének variabilitása áll, melyet a gyógyszer-metabolizmus egyéni működése nagyban meghatároz. Az egyedi különbségeket meghatározó tényezők feltárásával és szerepük megismerésével hozzájárulhatunk a biztonságos, mégis hatékony személyre szabott gyógyszeres terápiák kialakításához.

## **1.1 Neuroblasztóma megbetegedés általános ismertetése**

### **1.1.1 Epidemiológia**

A neuroblasztóma az egyik legelterjedtebb rosszindulatú szolid daganatos megbetegedés 5 év alatti gyermekek körében. Világviszonylatban az összes gyermekkori rákos megbetegedés 6%-át teszi ki, előfordulási gyakorisága 3-15 esetre tehető egymillió gyermekre vetítve. A közép-kelet európai újszülöttek esetében a nemek arányára az enyhe férfi dominancia jellemző, azonban ez az eltérés a két nem között a kor előrehaladtával, illetve neuroblasztóma altípusonként jelentősen csökken, sőt megfordul (Steliarova-Foucher et al., 2017; Georgakis et al., 2018). A hazai adatokat feldolgozó Országos Gyermektumor Regiszter adatai alapján Magyarországon a neuroblasztóma a leggyakoribb kisgyermeket érintő koponyán kívüli szolid tumoros megbetegedés; a 2001-2010 között regisztrált évenkénti esetszámok átlaga 18,5/millió főnek bizonyult (Garami et al., 2014).

### **1.1.2 Etiológia**

A neuroblasztóma kialakulása, illetve a neuroblaszt sejtek eredete eddig pontosan nem tisztázott. Feltételezhetően, a neuroblaszt sejtek a korai embrionális egyedfejlődés során a differenciálódó szimpatikus idegrendszerből származnak a velőcsőből (kezdetleges gerincvelőből) migráló szimpatoadrenális rendszer progenitor sejtjeiből, melyek a normál egyedfejlődés során mellékvese velőállományát alkotó sejtekké vagy az adrenerg rendszer szimpatikus neuronjaivá fejlődnek (Tsubota & Kadomatsu, 2018).

### 1.1.3 Diagnózis, klinikai megjelenés

A diagnosztizált betegek több mint 90%-a 10 év alatti gyermek, melynek egyharmada újszülött, illetve a megbetegedések kevesebb mint 5%-a jelenik meg serdülő- és felnőttkorban (London et al., 2005; Matthay et al., 2016). A beteg kora az egyik legfontosabb prognosztikai tényező; az 1-1,5 évnél fiatalabb betegek kedvezőbb betegség kimenetelre számíthatnak idősebb társaikhoz viszonyítva (Cohn et al., 2008). Az elsődleges tumor a szimpatikus idegrendszer mentén bárhol kifejlődhet, gyakori a mellékvese, a hasüreg és a retroperitoneális régió érintettsége, áttét esetén gyakoriak a nyirokcsomói, csont, illetve csontvelői, bőr és máj metasztázisok, melyek jelenlétét képalkotó eljárásokkal erősítik meg. A tumoros elváltozások megjelenési helye meghatározza a megbetegedés tüneteit. A betegség stádium-besorolását az *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) ajánlásai alapján állítják fel (Függelék 1. táblázat) (Monclair et al., 2009; Vo et al., 2014; Matthay et al., 2016). Érdekes megfigyelés, hogy a diagnózis felállításakor a betegek közel felénél mutatnak ki áttétet (DuBois et al., 1999). A kórisme részeként a betegek kora, stádium besorolása, valamint a betegség klinikai viselkedését befolyásoló biológiai (szérum ferritin és szérum laktát-dehidrogenáz) és tumor-szövettani (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived* [MYCN] gén státusza, tumorsejtek ploiditása és differenciáltsága, mitotikus-kariorrhexis-index [MKI], 11q, 1p, illetve 17q kromoszómát érintő aberrációk) jellemzők alapján alacsony, közepes vagy magas kockázatú betegcsoportokba sorolják be a betegeket (Cohn et al., 2008; Irwin et al., 2021). A neuroblasztóma megbetegedés lehetséges klinikai kimenetele, valamint a betegek terápiára adott válasza rendkívül változatos. Ismert, hogy a betegség viselkedése a spontán regressziótól az összes terápiára rezisztens, agresszív, áttétet képző daganatig terjedhet (Matthay et al., 2016; Whittle et al., 2017). A neuroblasztóma spontán regressziójának pontos háttere nem ismert feltételezhetően a daganatos sejtek telomeráz aktivitásának hiánya, a központi és perifériás idegrendszer fejlődésében fontos tropomiozin receptor kináz A (TrkA) neurotrofin receptor magasabb kifejeződése, illetve T-sejtek általi célzott tumorkárosítás is jelentősek a folyamatban (Brodeur, 2018).



#### **1.1.4 Patológia, tumorgenetika**

A tumorszövetnek három klasszikus szövettani formája ismert: a rosszindulatú neuroblasztóma és ganglioneuroblasztóma, valamint a jóindulatú ganglioneuróma. Elkülönítésük alapja a szöveteket alkotó sejtek differenciáltsága, a differenciálatlan neuroblaszt sejtek alkotta formától az érett sejtekből álló formáig terjedhet. A klinikai gyakorlatban a neuroblasztóma kedvező vagy kedvezőtlen hisztológiai besorolású lehet, mely többek között függ a sejt differenciáció mértékétől, valamint a mitotikus és „haldokló” sejtek arányától (MKI) (Shimada et al., 2001). Érdekes megfigyelés, hogy általában a triploid genetikai állományú sejtekből álló tumor kedvező kórjóslattal jár együtt, szemben a diploid vagy tetraploid DNS állományú sejtek alkotta tumorokkal (Schleiermacher et al., 2011). A neuroblasztóma tumorszövetet rendkívüli genetikai variabilitás jellemzi, csupán a betegek körülbelül 10%-ának tumorszövetét nem érinti kromoszóma-változás (Janoueix-Lerosey et al., 2009). A kromoszóma szegmenst érintő leggyakoribb változások kedvezőtlen kórjóslatot jelölnek (Aygün, 2018). Ezek közé tartozik a diagnosztikai jelentőséggel bíró *MYCN* onkogén amplifikációja, amely a 2p kromoszóma kar akár több százszoros amplifikációjának következménye. A *MYCN* amplifikáció az egyéb tényezőktől függetlenül magas kockázati besorolást jelent a betegeknél (Huang & Weiss, 2013). Továbbá ismert még az 1p és 11q kromoszóma karok deléciója, valamint a 17q kromoszóma kar amplifikációja (Aygün, 2018). Ezzel szemben érdekes módon a ploiditás változással járó teljes kromoszóma-vesztés, illetve nyeres *MYCN* nem-amplifikált esetekben kedvező kórjóslatot jelent (George et al., 2005). Továbbá, gyakori a telomeráz reverz transzkriptáz (TERT) génszakasz átrendeződése, valamint az ATP-függő helikáz (*ATRX*) gén mutációja, melyek a kromoszómák telomer régióit stabilizálva kerülnek el a replikációk miatt bekövetkező sejtöregedést és sejthalált (Valentijn et al., 2015; Hertwig et al., 2016).

#### **1.1.5 A neuroblasztóma megbetegedés terápiája**

A standardizált, nemzetközileg alkalmazott kezelési protokollok alapja a betegek kockázati besorolása, mely állhat a beteg klinikai megfigyeléséből, citoreduktív sebészeti beavatkozásból, alacsony kockázatú betegek esetén alacsony dózisú kemoterápiából vagy magas kockázatú betegeknél nagydózisú, multimodális terápiából (Qiu & Matthay, 2022). A magas kockázatú neuroblasztómában szenvedő betegek esetében a komplex

multimodális terápia ellenére is a hosszú távú túlélési arány csupán 40-50% (Whittle et al., 2017), míg az alacsony és közepes kockázatú neuroblasztómával diagnosztizált betegek moderált terápia mellett kedvező kimenetelre számíthatnak, közöttük a túlélési arány 90-95%-os (Meany, 2019).

A magas kockázati státuszú betegek multimodális terápiája szignifikánsan hozzájárult a túlélési statisztikák javulásához, különösen a magas dózisú kemoterápiát követő autológ őssejt transzplantáció bevezetésével, valamint az anti-GD2 elleni immunterápia alkalmazásával. A terápia elején a betegeket indukciós terápiaiban részesítik, ciklusonként váltakoztatva ciklofoszfamid, topotekán, etopozid, ciszplatin, vinkrisztin és doxorubicin meghatározott kombinációjával a metasztázisok csökkentése és a daganat sebészi úton történő hatékony eltávolítása érdekében (Qiu & Matthay, 2022). A *SIOP European Neuroblastoma Group* (SIOPEN) csoport tanulmánya alapján a ciklofoszfamidot is tartalmazó *Rapid COJEC* indukciós terápia alkalmazása jelentősen hozzájárult a betegek 5-éves eseménymentes túlélési rátájának emelkedéséhez (Pearson et al., 2008). Ebben a fázisban valósul meg a kemoterápiát kiegészítő autológ őssejt-transzplantációhoz a betegek saját csontvelői őssejtjeinek gyűjtése. Ezt követi magas dózisú mieloablatív konszolidációs kemoterápia, mely után a betegek károsodott csontvelőjét visszapótolják a már levett egészséges őssejtekkel. A fenntartó terápia fázisában a kemoterápiás kezelés kedvező kimenetelének elősegítésére immunterápiát alkalmaznak, illetve a csökkent tumorumen hosszú távú megőrzésére izotretinoin kezelésben részesítik a betegeket, mely ismertén elősegíti a neuroblaszt sejtek differenciációját és proliferációjuk csökkenését (Matthay et al., 2016; Qiu & Matthay, 2022). Az alacsony, illetve közepes kockázati státuszú betegek kezelése mérsékeltbb összehasonlítva a magas kockázati státusszal rendelkezők terápiájával, mégis kitűnő kimenetelre számíthatnak. Mérsékelt dózisú kemoterápiából (karboplatin, etopozid, ciklofoszfamid, doxorubicin), lokalizált, sebészi úton könnyen eltávolítható tumorra rendelkező betegeknél tumoreltávolító műtéttől vagy egyes esetekben csupán megfigyelésből épül fel terápiájuk (Whittle et al., 2017, Meany, 2019).

A neuroblasztóma gyógyszeres kezelésében az egyik leggyakrabban, a betegség kockázati besorolásától függetlenül alkalmazott hatóanyag a ciklofoszfamid, mely hatásmechanizmusának kialakulásában elengedhetetlen az enzimes biotranszformáció

(de Jonge et al., 2005; Meany, 2019; Qiu & Matthay, 2022). A ciklofoszfamid ismertetésére az 1.3 fejezetben kerül sor.

## **1.2 Gyógyszer-metabolizmus**

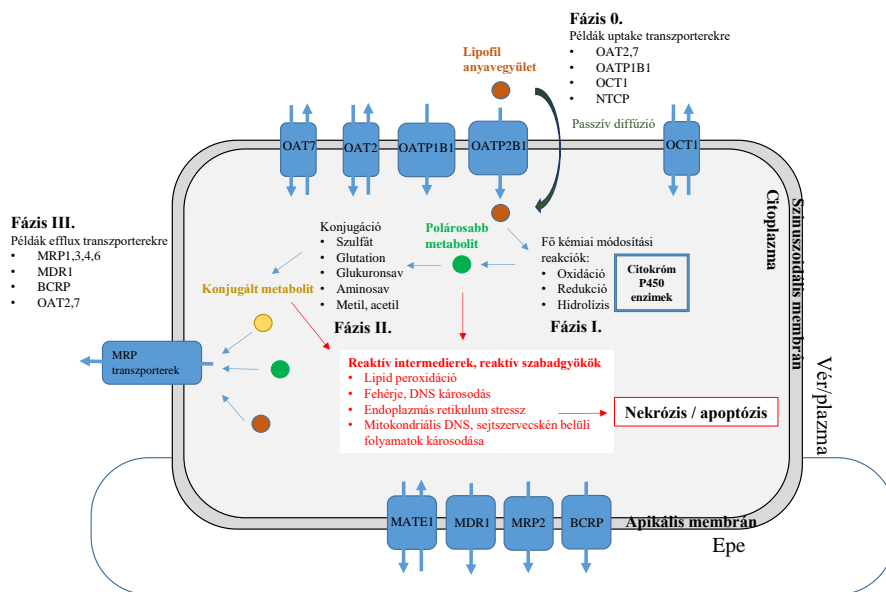
### **1.2.1 Gyógyszer biotranszformáció általános folyamata**

A farmakoterápia elengedhetetlen része korunk ismert betegségeinek gyógyításában. A gyógyszerek hatékonyságát és a mellékhatások megjelenését, azaz a beteg gyógyszeres terápiára adott válaszát döntően befolyásolja a hatóanyag farmakokinetikai viselkedése és metabolizmusa. Egy hatóanyag sorsa az emberi szervezetben a jól ismert ADME (*Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) folyamatokkal jellemezhető, melyek korfüggést mutató, nem lineáris változásokon mennek át az emberi fejlődés különböző szakaszaiban az újszülöttkortól kezdve az időskorig (Kearns et al., 2003; Mangoni & Jackson, 2003). A gyógyszer-hatóanyagok testidegen, többnyire lipofil vegyületek (xenobiotikumok), a szervezetben történő átalakulás során vízdékönyobbá válnak, melyben kulcsfontosságúak a gyógyszer-metabolizáló enzimek által katalizált kémiai reakciók. Végül a keletkezett vízdéköny metabolitok a vizeletbe vagy az epébe választódnak ki és ürülnek a szervezetből (Doogue & Polasek, 2013; Rendic & Guengerich, 2015). A gyógyszer biotranszformáció eredményeként a vegyületek általában inaktíválódnak, azonban egyes esetekben épp a metabolizmusnak köszönhetően alakul ki az aktív hatóanyag, illetve képződhet toxikus metabolit. Továbbá, egyes hatóanyagok metabolizmusa során reaktív intermedierek is képződhetnek, melyek a sejten belüli makromolekulákkal adduktokat képezhetnek, vagy reaktív szabad gyökök képződésével apoptózist és nekrozist indukálhatnak (Roth & Lee, 2017; Stanley, 2017).

A hatóanyagok átalakítása elsődlegesen a májban, kisebb mértékben más szervekben (pl. bélfalban, vesében, agyban, tüdőben) zajlik a Fázis 0-III. reakciók során a gyógyszer-metabolizáló enzimek, illetve transzmembrán transzporter fehérjék összehangolt működésével (1. ábra) (Roth & Lee, 2017; Manikandan & Nagini, 2018; Zhao et al., 2021). Az egyes Fázisokban szerepet játszó fehérjék (enzimek és transzporterek) expressziója és aktivitása szövetenként eltérő lehet, még összetettebbé téve a magzati, újszülött és kisgyermekkorban megfigyelhető fehérje kifejeződési, aktivitási mintázatokat, melyek így számottevően eltérhetnek a felnőttkorra jellemző állapottól.

Mindez egyes hatóanyagok esetében klinikailag is jelentős farmakokinetikai különbségekkel járhat (Kearns et al., 2003; van Groen et al., 2022). A Fázis 0. során a hatóanyagok májsejtekbe való bejutása sejtmembránon keresztüli passzív diffúzióval, vagy egy speciális transzporter családnhoz tartozó OATP (*organic anion transporting polypeptide*) fehérjék működésének köszönhetően történik (Stanley, 2017). A Fázis I. folyamatokban az oxidációs, redukciós, illetve hidrolitikus enzimreakciók során a lipofil hatóanyagok polaritása növekszik. Az átalakításokat katalizáló enzimek közül kiemelendők a citokróm P450 (CYP) enzimek, de a flavin monooxygenázok (FMOs, *flavin-containing monooxygenases*) és monoamin oxidázok (MAOs, *monoamine oxidases*) szerepe is jelentős (Roth & Lee, 2017). A Fázis II. reakciók során a hatóanyag már meglévő vagy a Fázis I. reakció során kialakult metabolit funkciós csoportjai egy hidrophil, endogén szubszttráttal (szulfát, glutation, glükuronsav, aminosav, metil-, acetyl-csoport) konjugálódnak és többnyire polárosabbá válnak, miközben az esetek nagy részében inaktiválódnak. A konjugált metabolit képzését például *N*-acetyltranszferázok, szulfotranszferázok, glükuronil-transzferázok és a glutation-*S*-transzferázok (GST-k) katalizálják (Stanley, 2017). A keletkezett vízdékony konjugátumok további átalakításokon mehetnek keresztül (pl. a glutation konjugátumokról lehasadhat a glutamát és a glicin) mielőtt a Fázis III. folyamatok során energia-függő efflux-transzporter fehérjék kijuttatják a sejtéből a szisztémás keringésbe vagy az epébe. Példaként hozható fel az ABC (*ATP-binding cassette*) transzporter családba tartozó P-glikoprotein (Li et al., 2009; Roth & Lee, 2017).

A gyógyszerek biotranszformációjának összetett folyamata során a hatóanyagok számos kémiai módosításon mennek át, amelyet zömmel a CYP enzimek katalizálnak, ezáltal aktivitásuk meghatározó a gyógyszer-metabolizmusban (Rendic & Guengerich, 2015).



1. ábra: A gyógyszerek felvételének, biotranszformációjának és exkréciójának általános, egyszerűsített folyamatai hepatocitákban. A példakként felhozott transporterek rövidítései: MRP (*multidrug resistance-associated protein*). BCRP (*breast cancer resistance protein*). OCT (*organic cation transporters*). MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (Roth & Lee, 2017; Manikandan & Nagini, 2018).

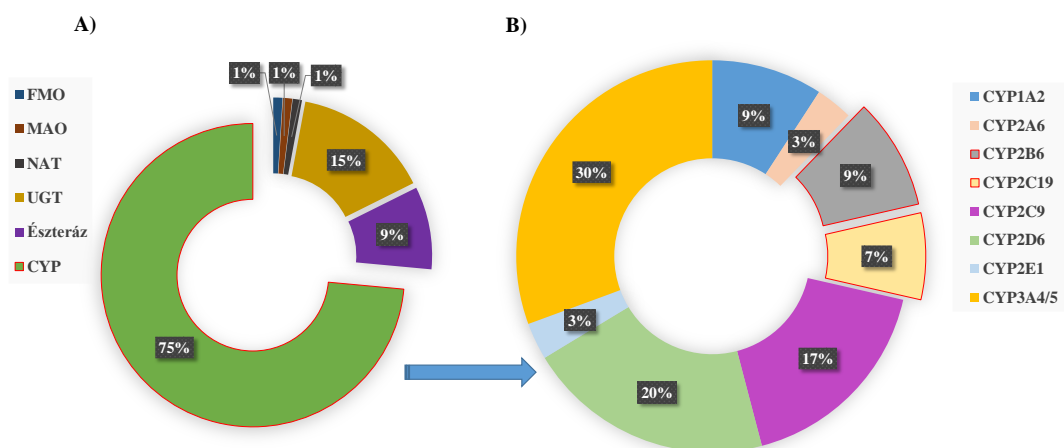
### 1.2.2 A CYP enzimek általános ismertetése

A citokróm P450 elnevezés abból fakad, hogy a redukált enzim szén-monoxiddal alkotott komplexe 450 nm-en intenzív fényelnyelést mutat (Manikandan & Nagini, 2018). Több ezer CYP enzimet azonosítottak az élővilág egyes csoportjaiban, kezdve a baktériumoktól egészen az emberig (Martignoni et al., 2006; Lamb et al., 2009). A CYP izoenzimek rendkívüli változatossága, mely többek között a CYP izoenzimek számában, strukturális és működésbeli diverzitásában, szövetspecifikus kifejeződésében és az átalakított vegyületek, valamint a katalizált reakciók nagy számában nyilvánul meg, emeli ki ezeket az enzimeket a számtalan gyógyszer-metabolizáló enzim közül.

A CYP enzimek a hem-tiolát fehérjék közé tartozó kevert funkciójú monooxigenázok. Katalitikus ciklusuk során a szubsztrátok oxidációját katalizálják molekuláris oxigén egyik atomjának beépítésével, míg a másik oxigén egy vízmolekula képződéséhez vezet, mely során az  $\alpha$ -nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) kofaktor szolgáltatja az elektronokat. Az elektrontranszport létrejöttét a NADPH-citokróm P450 reduktáz, illetve néhány esetben a NADH-citokróm b<sub>5</sub>-reduktáz enzim katalizálja, melyek a CYP enzimekkel multienzim komplexet alkotnak a sima felszínű endoplazmatikus retikulum,

valamint a mitokondrium membránjában (Manikandan & Nagini, 2018). A fiziológias körülmények között lejátszódó reakció rendkívül fontos mind a xenobiotikumok (testidegen anyagok), köztük karcinogének, gyógyszer-hatóanyagok, növényvédőszer biotranszformációjában, mind az endogén vegyületek bioszintézisében, többek között zsírsavakéban vagy szteroid hormonokéban (Hamdane et al., 2008). Az aktív hem-vas centrum egy erősen konzervált cisztein tiolát kötésen keresztül kapcsolódik az egyetlen 400-500 aminosavból felépülő polipeptid lánchoz. Az aktív centrum közelében fordulnak elő a leginkább konzervált fehérje régiók, például a molekuláris oxigén megkötésére szolgáló régió. A CYP enzimek harmadlagos szerkezetét alkotó számos hélix és  $\beta$ -redő struktúra, valamint ezeknek a régióknak a változatossága hozzájárul a rendkívüli strukturális variabilitásukhoz, így számos, különböző kémiai szerkezetű szubsztrát molekula hatékony kötéséhez (Hill et al., 1970; Cryle & Schlichting, 2008; Zhao et al., 2021).

Emberben 57 funkcionális CYP izoenzimet azonosítottak, melyeket a 40%-os aminosav-szekvencia egyezés alapján 18 családba, illetve 55%-os aminosav-szekvencia egyezés alapján 44 alcsaládba sorolnak. Nemzetközileg elfogadott nevezéktanuk szerint a CYP rövidítést követő első szám a családot, a nagybetű az alcsaládot, a második szám az adott enzimet jelöli (pl. CYP2D6) (Manikandan & Nagini, 2018). A CYP szupercsalád tagjai közül a gyógyszer-metabolizmusban a CYP1, CYP2 és CYP3 alcsaládokba tartozó enzimek vesznek részt és felelnek a forgalomban lévő hatóanyagok körülbelül 75%-ának átalakításáért. A hatóanyagok metabolizmusához legnagyobb részben a CYP3A (~30%), CYP2D6 (~20%) és CYP2C9 (~17%) enzimek járulnak hozzá (2. ábra) (Zanger & Schwab, 2013; Zhao et al., 2021). A gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek további fontos jellegzetessége, hogy széles és átfedő szubsztrátspecificitással rendelkeznek. Például a CYP3A4 és CYP3A5 izoenzimek átfedő szubsztrát specifitásához az enzimek elsődleges aminosav sorrendjének nagyfokú hasonlósága vezet. A CYP3A-szubsztrát takrolimusz immunszuppresszáns metabolizmusát működőképes CYP3A5 hiányában a CYP3A4 katalizálja, azonban a funkcionális CYP3A5 fehérjét expresszáló betegekben a CYP3A5 válik a metabolizmus meghatározó enzimévé (Zanger & Schwab, 2013).



2. ábra: A Fázis I. és Fázis II. enzimek szerepe a gyógyszerek metabolizmusában. A) A gyógyszer-metabolizmust katalizáló enzimek hozzájárulása (%) a klinikumban alkalmazott hatóanyagok metabolizmusához. B) A legfontosabb CYP izoenzimek hozzájárulása a gyógyszerek átalakításához kiemelve a disszertáció szempontjából jelentős CYP2B6 és CYP2C19 izoenzimek adatait (Zanger & Schwab, 2013; Zhao et al., 2021).

A májban az egyes CYP enzimek kifejeződése eltérő és egyénenként akár több nagyságrend különbséget is mutathat (1. táblázat), melyet különböző májspecifikus transzkripciós faktorok többek között hepatikus nukleáris fehérjék (HNF-1 $\alpha$ , HNF-3, HNF-4 és C/EBP $\beta$ ) szabályozzák egyéb, nem májspecifikus faktorokkal (pl. SP1, GAPB $\alpha/\beta$ , NF2d9) együttműködve (Gonzalez & Lee, 1996). Közülük a máj CYP tartalmának több mint 30%-át a CYP3A alcsaládba tartozó enzimek teszik ki, a CYP2C9 közel hasonló mértékben fejeződik ki, illetve a CYP1A2 enzim mennyisége is jelentős (Ohtsuki et al., 2012; Achour et al., 2014; Zanger & Schwab, 2013). Az extrahepatikus szervek közül a bél CYP aktivitása a szájon át adagolt gyógyszereknél lényeges. Egy beteg gyógyszer-metabolizáló kapacitását alapvetően a máj, kisebb mértékben a vékonybél gyógyszer-metabolizáló CYP enzimeinek egyedi működése határozza meg, nagymértékben hozzájárulva a betegek gyógyszer-metabolizáló képességének variabilitásához (Liu et al., 2021).

Egyre nagyobb hangsúly kerül a tumorszövetben kifejeződő CYP enzimek szerepének megismerésére. A tumorszövet májtól független gyógyszer-metabolizmusa hatással lehet a kemoterápia-rezisztencia kialakulására, amely tumor relapszussal és kedvezőtlen kimenetellel járhat (Rochat, 2005; Zhao et al., 2021). Például egy nemrégiben megjelent

tanulmányban tüdő adenokarcinomával diagnosztizált betegek esetén összefüggést találtak a tumorszövetben mérhető *CYP2C8* és *CYP3A4* kópiaszáma és a paklitaxel terápiára adott válasz között (Incze et al., 2023).

1. táblázat: A legfontosabb gyógyszer-metabolizáló CYP izoenzimek kifejeződése a májban, kiemelve a disszertáció szempontjából releváns *CYP2B6* és *CYP2C19* enzimet (Achour et al., 2014; Ohtsuki et al., 2012; Zanger & Schwab, 2013).

	<b>CYP izoenzimek expressziójának aránya a májban (%)</b>
CYP1A2	13-15
<b>CYP2B6</b>	<b>1-4</b>
CYP2C8	~7,5
CYP2C9	4,5-29
<b>CYP2C19</b>	<b>~3</b>
CYP2D6	2-3
CYP2E1	5,5-7
CYP3A4/5	14,5-37

### 1.2.3 CYP enzimaktivitást, kifejeződést befolyásoló genetikai tényezők

A gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek variabilitása aktivitásukban is megnyilvánul, melyet elsősorban több száz eddigiekben leírt genetikai variáns határoz meg. A polimorf CYP allélvariánsok listáját a PharmVar (*Pharmacogene Variation Consortium*) (2023/07) online adatbázisa összegzi.

Általánosságban elmondható, hogy a farmakogenetikai polimorfizmusok a populáció  $\geq 1\%$ -ban előforduló szekvencia variánsok, amelyek közül számos allélvariáns klinikailag releváns hatással van a CYP enzimműködésre és meghatározó az egyének és etnikumok között megfigyelt variabilitás kialakulásában (Zanger & Schwab, 2013). A CYP gének exonjaiban vagy intronjaiban a nukleotid cserével, delécióval vagy beépüléssel járó, egybázist érintő szekvencia-variánsok (SNV-k, *single nucleotide variations*), illetve a teljes, vagy részleges génszakaszt érintő mennyiségi változások (CNV-k, *copy number variations*) fordulnak elő. Az enzimfunkció emelkedése (GoF, *gain-of-function*) jellemzően kópiaszám többszöröződéssel, transzkripció emeléssel együtt járó promóter variánsok, illetve aminosav-cserét tartalmazó fehérje variánsok kialakulása következtében figyelhető meg és növeli a hatóanyag kiürülést, párhuzamosan a hatóanyag plazma koncentrációjának csökkenésével. Az enzimfunkció csökkenése, vagy akár teljes



megszűnése (LoF, *loss-of-function*) jellemzően kópiaszám kiesés, keret-eltolódás miatti korai STOP kodon által módosult transzkripció, illetve alternatív *splicing* mechanizmusok miatt képződött mRNS variánsok következtében alakul ki. Szükségszerűen magával hordozza a hatóanyag kiürülésének csökkenését, míg a plazmában mérhető hatóanyag koncentráció növekszik (Johansson & Ingelman-Sundberg, 2008; Stanley, 2017; Zhao et al., 2021).

Ha a genotípus és a kialakult fenotípus között korreláció áll fenn, akkor a genotípus alkalmas a fenotípus indirekt jellemzésére. A *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) CYP-genotípus alapú dozírozási ajánlásokat tett közzé számos CYP-szubsztrát esetén, melyek elősegítik a szűk terápiás tartományú hatóanyagok terápiás hatékonyságának maximalizálását, illetve metabolikus aktiváció esetén a hatóanyag magas plazma szintje miatt kialakult toxikus mellékhatások elkerülését a hatóanyag optimális plazma koncentrációjának biztosításával. Például efavirenz terápián lévő betegek *CYP2B6* genotípusa alapján, valamint klopidozrel terápia esetén a *CYP2C19* genotípus alapján gyenge (PM), intermediér (IM), normál (NM), gyors (RM), illetve ultragyors (UM) CYP metabolizáló fenotípusokat különböztetnek meg (Függelék 2. táblázat) (Desta et al., 2019; Lee et al., 2022).

#### **1.2.4 CYP enzimaktivitást, kifejeződést befolyásoló nem-genetikai tényezők - a fenokonverzió jelensége**

A CYP genotípus alapján javasolt gyógyszeres terápia azonban hordoz némi bizonytalanságot magában, számos tanulmányban a prediktált fenotípus ugyanis nem egyezik meg a mért fenotípussal, amely megnehezíti a genotípus alapú személyre szabott terápiák alkalmazását a klinikai gyakorlatban. Ez a jelenség a fenokonverzió, mely a genetikai háttér által meghatározott metabolizáló kapacitás átmeneti megváltozására vezethető vissza. A fenokonverzió számos nem-genetikai, egyén (genetikai) és betegség-specifikus tényező hatására jöhet létre, melyek jelentős mértékben módosíthatják a genotípus alapján becsülhető fenotípust. Így válhat egy genotípusosan ultragyors gyógyszer-metabolizáló kapacitással rendelkező betegből gyenge metabolizáló (Shah & Smith 2015; Klomp et al., 2020).

A fenokonverzió legjelentősebb gyakorlati tényezői közé az egyidejűleg több hatóanyag alkalmazásával kialakuló gyógyszer-interakciók tartoznak (DDIs, *drug-drug*

*interactions*), melyek a gyógyszeres terápia mellett bekövetkező toxikus, akár fatális kimenetelű mellékhatások kialakulásáért nagymértékben felelnek és elsődlegesen a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP enzimek indukciója, illetve gátlása során alakulnak ki (Hakkola et al., 2020; Klomp et al., 2020). A CYP expresszió és enzimfunkció növekedéséért a xenobiotikumokra érzékeny nukleáris receptorok, transzkripciós faktorok, ko-aktivátorok által szabályozott összetett transzkripciós mechanizmusok felelősek (Zanger & Schwab, 2013). A legfontosabb nukleáris receptorok közé a „*pregnane*” X receptor (PXR), a „*constitutive androstane*” receptor (CAR), az aromás szénhidrogén receptor (AhR), illetve a glükokortikoid receptor (GR) tartozik, melyeket az induktorok közvetve jelátviteli útvonalakon keresztül vagy közvetlenül aktiválnak (Manikandan & Nagini, 2018; Zhao et al., 2021). Az aktivált nukleáris receptorok a sejtmagban dimerizációs partnerükhöz kötődnek, a PXR és CAR az  $\alpha$  retinoid X receptorral (RXR $\alpha$ ), míg az AhR az AhR nukleáris transzlokátorral (Arnt) heterodimert, a GR homodimert képez. Az így kialakult komplexek a promóter megfelelő régiójához kötődve fokozzák a gének átíródását (Goodwin et al., 1999, 2002; Manikandan & Nagini, 2018). A PXR/RXR $\alpha$  fehérjekomplex elsősorban a *CYP3A* gének expresszióját növeli, de ismert, hogy a CYP2B, illetve CYP2C enzimesalád tagjainak expresszióját is indukálja (Goodwin et al., 1999, 2001, 2002; Chen & Goldstein, 2009). A fenobarbitál vagy fenobarbitál-szerű hatóanyagok által aktivált CAR elsősorban *CYP2B6* gén expresszióját emeli, azonban leírták a CAR szerepét a *CYP2C9*, *CYP2C19* és *CYP3A4* gének transzkripció fokozódásában is (Zelko & Negishi, 2000; Chen & Goldstein, 2009). A glükokortikoidok közvetlenül és közvetetten is fokozzák az CYP gének átíródását a GR-on keresztül, másrészt a CAR és PXR expresszióját is befolyásolják, így közvetetten növelik a CAR és PXR által szabályozott gének transzkripcióját. Például a CYP2B6 átíródásának fokozása a glükokortikoid hatásra bekövetkező CAR mRNS expresszió emelkedésének következménye (Pascussi et al., 2000). Az AhR receptor az AhR/Arnt fehérjekomplex kialakításával a CYP1A alcsalád enzimeinek kifejeződését fokozzák (Manikandan & Nagini, 2018). Érdeemes megemlíteni, hogy egyes CYP enzimek indukciója nem-transzkripciós folyamatokon keresztül is bekövetkezhet, például az mRNS és enzimfehérje stabilitásának növelésével (Pelkonen et al., 2008; Zhao et al., 2021).

Klinikumban alkalmazott számos hatóanyagról ismert, hogy kompetitív, nem-kompetitív módon, illetve mechanizmus alapú folyamatok útján gátolják a CYP enzimek aktivitását. A gyógyszer-hatóanyagok reverzibilis, illetve irreverzibilis CYP-gátló hatása közvetlenül befolyásolja a CYP enzimfehérje működését (Pelkonen et al., 2008; Hakkola et al., 2020). Mechanizmus alapú gátlás ismert a CYP2B6 és gátlószere, a thiotepa interakciója esetén, melynek lényege, hogy a gátlószert metabolizmus során képződő reaktív intermedier stabil komplexet alkot az enzimmel és elfedi az enzim szubsztrát-kötőhelyét, így csökkentve a CYP2B6-szubsztrátok számára elérhető CYP2B6 enzimkoncentrációt (Pelkonen et al., 2008; Turpeinen & Zanger, 2012; Deodhar et al., 2020). A CYP gátlás következtében a hatóanyag plazma szintje megnő, mely a gyakorlatban elégtelen terápiás válasz és toxikus mellékhatások kialakulásához vezethet. A kompetitív és nem-kompetitív gátlás miatt visszaszorult enzimműködés átmeneti és megszűnik ha a gátlószert eliminációja bekövetkezik, azonban a mechanizmus alapú gátlószerek által okozott irreverzibilis gátlás addig tart, míg új működőképes enzimfehérje nem szintetizálódik (Deodhar et al., 2020; Zhao et al., 2021).

A CYP enzimek expresszióját az életkor és a nem befolyásolhatja, ezért e két tényezőt is fenokonverziós hatásnak tekinthetjük. Érdeemes figyelembe venni az egyedfejlődési szakaszokra jellemző CYP kifejeződési és aktivitás mintázatot. Egyes CYP enzimek egy adott életkorban nem expresszálódnak, mint az elsődlegesen magzati korban aktív CYP3A7, amelynek kifejeződése a májban megszűnik a születés után, vagy a CYP2E1, amely magzati korban nem mutatható ki, majd születés után az expressziója fokozódik. Másrészt időskorban a máj méretének, illetve vérellátásának szükségszerű megváltozása csökkentheti egyes CYP enzimek expresszióját (pl. CYP1A2, CYP3A4) (Lacroix et al., 1997; Mangoni & Jackson, 2003; Hines 2008; Liu et al., 2021). A nők és férfiak eltérően reagálhatnak ugyanazon gyógyszeres terápiára, mely a gyógyszer-metabolizmus nemek közötti eltéréseiből is fakadhat (Soldin & Mattison, 2009). Rágcsálókban markáns a nemek közötti különbség a CYP enzimek expressziójában, míg emberben marginális (Waxman & Holloway, 2009; Renaud et al., 2011). A humán CYP3A enzimek expressziójával kapcsolatban különbséget jegyeztek fel nőknél és férfiaknál, míg más humán CYP enzimeknél a hatás nem ennyire egyértelmű (Zanger & Schwab, 2013; Liu et al., 2021).

A fenokonverziós hatás kialakulásáért felelős további fontos tényezőt jelentenek a megbetegedések (pl. májbetegségek, daganat, fertőzések) és a betegségek alatt fennálló kóros folyamatok, mint a gyulladás és az oxidatív stressz, melyek a CYP enzimek repressziójához vezetnek (Shah & Smith, 2015). Számos hatóanyag májkárosító hatása ismert (DILI, *drug-induced liver injury*) (Teschke & Danan, 2021). Az amoxicillin és klavulánsav kombinációját széleskörűen alkalmazzák bakteriális fertőzések kezelésében, melynek mérsékelt hepatotoxikus hatást tulajdonítanak, súlyos májkárosító hatás ritkán fordul elő (deLemos et al., 2016; Huttner et al., 2020). Azonban, Teschke és mtsi tanulmányában az amoxicillin+klavulánsav kombináció első helyen szerepel mint potenciális májkárosodást előidéző hatóanyag (Teschke, 2018). Krónikus alkoholfogyasztók körében igen gyakori a zsírmáj kialakulása (ALD, *alcoholic liver disease*). A nagymértékű, gyakori alkoholbevitel által kiváltott kóros folyamatok, például az emelkedett proinflammatorikus citokin koncentrációval együtt járó gyulladás vagy az oxidatív stressz magyarázhatják az alkoholos májbetegségek progresszióját, mely során a májszövet súlyos, irreverzibilis patológiás állapotai alakulhatnak ki (Ceni, 2014; Gao & Tsukamoto, 2016). A gyulladással összefüggő gyógyszer-metabolizáló kapacitás átmeneti fenotípusos megváltozása a klinikai gyakorlatban a CYP gátláshoz hasonlóan a hatóanyag emelkedett plazma szintjéhez és toxikus mellékhatások kialakulásához vezethet (Aitken et al., 2006; Shah & Smith, 2015). Például interleukin-6 (IL-6) kezelt humán hepatokarcinoma sejtekben a PXR és CAR nukleáris receptorok által közvetített CYP-indukció csökkenését figyeltek meg, míg az AhR függő útvonalak változatlanok bizonyultak (Tanner et al., 2018). A gyulladási mediátorok mRNS expresszió, illetve enzimaktivitás csökkentő hatása a CYP3A4 és a CYP2B6 esetén hasonlóan markáns, míg a CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19 enzimek kisebb érzékenységet mutatnak, és az érzékenység mértéke a proinflammatorikus stimulus mennyiségétől függ (Dickmann et al., 2011; Rubin et al., 2015). Továbbá, a különböző proinflammatorikus citokinek hatása CYP-specifikusnak bizonyult (Aitken & Morgan, 2007; Rubin et al., 2015). A különböző patológiás állapotok által indukált gyulladási folyamatokban elsődlegesen azon CYP izoenzimek szuppressziója figyelhető meg, melyek PXR, illetve CAR szabályozás alatt állnak, köztük a CYP3A, CYP2C, illetve CYP2B enzimeké (Dickmann et al., 2011; Rubin et al., 2015; de Jong et al., 2020).

A fentiekben kiemelt tényezők és folyamatok listája korántsem teljes, a disszertáció szempontjából releváns ismeretekre fókuszál. További fenokonverziós faktorok meghatározásával, valamint a fenokonverziós faktorok mechanizmusainak és az egyes CYP-ek érintettségének bővebb ismeretében tovább fejleszthető a farmakogenetikai ismereteken alapuló személyre szabott terápia gyakorlati alkalmazása (Klomp et al., 2020).

### **1.2.5 A ciklofoszfamid metabolizmusában jelentős CYP izoenzimek**

A neuroblasztóma megbetegedések gyógyszeres terápiájának részét képező ciklofoszfamid metabolizmusában a CYP2B6 enzim meghatározó, míg a CYP2C19 másodlagos szerepet tölt be (de Jonge et al., 2005). Az alábbiakban részletesen bemutatom a CYP2B6 és CYP2C19 enzimműködést meghatározó folyamatokat.

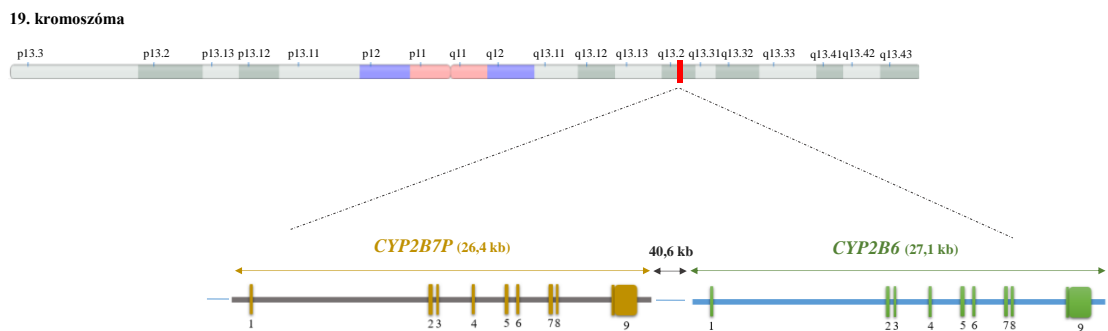
#### **1.2.5.1 CYP2B6**

A humán CYP2B6 a CYP2B enzimalcsalád egyetlen aktív enzime, a humán *CYP2B7* pszeudogén (*CYP2B7P*) egy korai stopkodont tartalmazó transzkript variánst expresszál, amely nem eredményez aktív enzimet (Yamano et al., 1989; Nelson et al., 2004).

A CYP2B6 fehérje hepatocitákban szignifikáns mennyiségben kimutatható, azonban az egyik legalacsonyabban kifejeződő CYP izoenzim a májban (1-4%) (1. táblázat) (Zanger & Schwab, 2013; Achour et al., 2014). Ennek ellenére az egyik legnagyobb egyéni variabilitással rendelkező CYP enzim, fehérje expressziójában akár 100-szoros különbségek is kimutathatók (Hedrich et al., 2016a). Extrahepatikus szövetekben (pl. a tüdőben, a bél enterocitáiban) ennél is csekélyebb mértékben fejeződik ki, viszont az agyban detektálható CYP2B6 fehérjének funkcionális szerepe van néhány központi idegrendszerre ható szer metabolizmusában (Thelen & Dressman, 2009; Leclerc et al., 2010; Ferguson & Tyndale, 2011). A CYP2B6 enzim a klinikumban alkalmazott hatóanyagok 8-10%-ának metabolizmusát katalizálja (2. ábra), többek között az antidepresszáns bupropion, az antiretrovirális efavirenz, a daganatellenes és immunszuppresszáns ciklofoszfamid, a fájdalomcsillapító ketamin és metadon, valamint az antimaláriás szer artemizinin átalakítását végzi (Turpeinen & Zanger, 2012; Hedrich, et al., 2016a). A CYP2B6 aktivitás *in vitro* jellemzésére a *S*-mefenitoin demetilizését nirvanollá, a bupropion hidroxilezését, valamint az efavirenz oxidatív hidroxilezését

alkalmazzák szelektív marker-reakcióként (Heyn et al., 1996; Faucette et al., 2000; Ward et al., 2003).

A *CYP2B6* allélvariánsok egy vagy több SNV-t is tartalmazhatnak, továbbá, egy adott SNV-t több allélvariáns is hordozhat. A *CYP2B6* haplotípus becslést megnehezíti egyrészt a *CYP2B6* genetikai diverzitása, másrészt a *CYP2B7* pszeudogénnel leírt magas exonszekvencia-homológia ( $\geq 96\%$ ) (a *CYP2B7P*-specifikus *off-target* amplifikáció miatt). A *CYP2B6* és *CYP2B7P* gének a CYP2 enzimesalád génklaszterében találhatók a 19. kromoszóma hosszú karján. Valószínűsíthetően egy *CYP2B* „ösgén” tandem duplikációjával jöttek létre, amely magyarázhatja a két gén magas nukleotidszekvencia-homológiáját, illetve a gének szerkezetének rendkívüli hasonlóságát (3. ábra) (Miles et al., 1988; Hoffman et al., 2001; Desta et al., 2021).



3. ábra: A *CYP2B6* és *CYP2B7P* gének szerkezete és elhelyezkedése a 19. kromoszómán [National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene *CYP2B6* (2023/10), NCBI Gene *CYP2B7P* (2023/10) online adatbázis információi alapján]

#### 1.2.5.1.1 A *CYP2B6* polimorf allélvariánsai

A PharmVar 49 *CYP2B6* allélt listáz, melyek száma folyamatosan nő; a disszertáció írása közben 10 új allél információinak feltöltése volt folyamatban Zhang és mtsai által. Több allélvariáns jelenlétével az enzimaktivitás emelkedését, illetve csökkenését, valamint kiesését hozták összefüggésbe [Desta et al., 2021; PharmVar *CYP2B6*. (2023/07)].

A klinikailag is jelentős funkcióváltozást okozó *CYP2B6* allélok gyakoriságában nagy etnikai különbségeket írtak le (Zanger & Klein, 2013; Zhou & Lauschke, 2022). A legelterjedtebb allél a *CYP2B6*\*6, melynek gyakorisága 14-28,15%, 10-21%, illetve 33-50% az európai, ázsiai és afrikai/afrikai-amerikai populációban. A *CYP2B6*\*5 allél viszonylag gyakori az európai populációban (9-12%), míg más populációkban ritkán mutatható ki (1-4%). Az ázsiai népességben a *CYP2B6*\*4 allél többé-kevésbé gyakori (5-

12%), míg az európai populációkban kevésbé elterjedt (2-6%), és nem kimutatható az afrikaiaknál vagy afro-amerikaiaknál. A *CYP2B6*\*9 allél gyakorisága 4-5% az ázsiai és afrikai populációkban, szemben az európai populációkban leírt 1-2%-os gyakorisággal. A *CYP2B6*\*22 és *CYP2B6*\*7 variánsok minden populációban ritkák (<2,5%). További csökkent, illetve teljes enzimaktivitás kieséssel járó *CYP2B6* allélvariánsok rendkívül ritkák, bár a *CYP2B6*\*18 gyakran fordul elő afrikai (5-12%) és afro-amerikai (4-8%) populációkban.

A *CYP2B6* enzim működését és expresszióját elsősorban a *CYP2B6* gén genetikai variánsai határozzák meg; a *CYP2B6* legfontosabb allélvariánsainak listáját a 2. táblázat tartalmazza. A *CYP2B6*\*22 variáns egy mutációt tartalmaz a gén promóterében (rs34223104, g.-82T>C), mely a *CYP2B6* gén fokozott expressziójához vezet módosult transzkripció mechanizmuson keresztül (Li et al., 2010). A *CYP2B6*\*22 allélvariánst heterozigóta formában hordozóknál növekedett *CYP2B6* transzkripcióról és bupropion-hidroxiláz aktivitásról számoltak be (Zukunft et al., 2005). A *CYP2B6*\*4 allél egy lizin-arginin aminosavcserét tartalmaz (rs2279343, g.18053A>G), amely szerkezetében módosult *CYP2B6* enzimvariánst és a *CYP2B6* efavirenz-hidroxiláz aktivitás növekedését eredményezi (Bumpus et al., 2005, 2008; Wang et al., 2019; Desta et al., 2021). Továbbá, a metadon, a bupropion és az efavirenz hatóanyagok esetén is kimutatták, hogy kiürülésük fokozódott *CYP2B6*\*4 allélt hordozó egyéneknél (Rotger et al., 2007; Kharasch & Crafford, 2019). A *CYP2B6*\*6 allélban ugyanazt az enzimfunkció fokozásával járó lizin-arginin aminosavcserét (rs2279343, g.18053A>G) azonosították, mint a *CYP2B6*\*4 allélban. Ezenkívül a *CYP2B6*\*6 allélban kimutatható a g.15631G>T (rs3745274, Gln172His) báziscsere, melyről egy alternatív mRNS splicing folyamat csökkent *CYP2B6* mRNS és enzimfehérje expressziót és ennek következtében csökkent *CYP2B6* aktivitást eredményez a májban (Hofmann et al., 2008). Ezek alapján feltételezhető, hogy a *CYP2B6*\*4 allélnél magas enzimaktivitáshoz vezető g.18053A>G variáns hatását a *CYP2B6*\*6 allélban kapcsoltan előforduló g.15631G>T csere megfordítja (Ariyoshi et al., 2011). Az *S*-metadon és az efavirenz kiürülésének csökkenéséről számoltak be *CYP2B6*\*6 allélt homo,- vagy heterozigóta formában hordozó betegeknél, míg a bupropion enantiomerek csökkent hidroxilációját csak a *CYP2B6*\*6/\*6 hordozó egészséges önkénteseknél figyelték meg (Rotger et al., 2007; Kharasch & Crafford, 2019). A g.15631G>T (rs3745274, Gln172His) nukleotid

szubsztitúció kimutatható a *CYP2B6*\*9 allélban is, mely a *CYP2B6*\*6 allélhoz hasonlóan *in vitro* csökkent enzimaktivitást (bupropion- és efavirenz-hidroxiláz) eredményezett (Zhang et al., 2011; Wang et al., 2019); azonban a *CYP2B6*\*9 allél klinikai jelentőségéről csekély információ áll rendelkezésre, mivel minden populációban alacsony az előfordulási gyakorisága. A *CYP2B6*\*5 allélban található g.25505C>T (rs3211371, Arg487Cys) nukleotid-cserének enyhe, illetve elhanyagolható hatása volt a *CYP2B6* katalitikus aktivitására, bár néhány tanulmány szerint szignifikánsan befolyásolja a *CYP2B6* fehérje expresszióját (Lang et al., 2001; Desta et al., 2007; Rotger et al., 2007; Kharasch et al., 2015; Kharasch & Crafford, 2019). A *CYP2B6*\*7 allélvariánsban a g.15631G>T, g.18053A>G és g.25505C>T SNV-k együttesen fordulnak elő, amely a rekombináns fehérje variánsokkal végzett *in vitro* vizsgálatok szerint jelentősen megnövekedett bupropion-hidroxiláz, illetve 7-etoxi-4-trifluórmetil-kumarin O-deetiláz aktivitást eredményez (Jinno et al., 2003; Zhang et al., 2011; Wang et al., 2019; Watanabe et al., 2018). A *CYP2B6*\*7 variáns klinikai jelentősége alacsony előfordulási gyakorisága, illetve meghatározásának nehézségei miatt kérdéses, azonban ciklofoszfamid terápia által indukált májkárosodást az allélvariáns jelenlétével hozták összefüggésbe egy emlőrákos betegen (Ming et al., 2019). A *CYP2B6*\*18 variánsban lévő báziscserének (rs28399499, g.21011T>C, I328T) null-aktivitást tulajdonítanak, a fehérje- és enzimaktivitás kiesését, illetve csökkenését számos *in vitro* és *in vivo* tanulmányban kimutatták (Klein et al., 2005; Rotger et al., 2007; Ribaudó et al., 2010; Honda et al., 2011; Gadel et al., 2015; Röhrich et al., 2016; Desta et al., 2019; Wang et al., 2020). A *CYP2B6*\*18 allélvariánshoz társított alacsony enzimaktivitás többek között hozzájárult az efavirenz magas koncentrációjához plazmában, illetve hajban (Rotger et al., 2007; Ribaudó et al., 2010; Röhrich et al., 2016). A PharmVar adatbázisában útmutatás található a *CYP2B6* diplotípus-fenotípus becslésről a *CYP2B6* allélvariánsok fenotípusos jellemzőinek standardizált és könnyen értelmezhető osztályozásával [PharmVar *CYP2B6*. (2023/07)]. Az allél-funkcionalitás meghatározásának szigorú kritériumai elősegíthetik a klinikai gyakorlatban alkalmazott *CYP2B6* szubsztrátokra is átvezethető dozírozási ajánlásokat. Az efavirenz antiretrovirális hatóanyagra és a szertralin antidepresszánsra vonatkozóan elérhető *CYP2B6* genotípus alapú dozírozási javaslat (Függelék 2. táblázat) (Desta et al., 2021, 2019, Bousman et al., 2023).



2. táblázat: A klinikailag jelentős enzimfunkció-változásért felelős *CYP2B6* allélvariánsok

<i>CYP2B6</i> allélvariánsok	Nukleotid csere	Aktivitás/Expresszió <sup>a</sup>	Allélgyakoriság (%; kaukázusi populációk) <sup>b</sup>
<i>CYP2B6*4</i>	g.18053A>G (5. exon)	Aktivitás ↑	2,2-6,2
<i>CYP2B6*5</i>	g.25505C>T (9. exon)	mRNS expresszió és aktivitás ↔	9-12,2
<i>CYP2B6*6</i>	g.15631G>T és g.18053A>G	mRNS expresszió és aktivitás ↓	7-28,15
<i>CYP2B6*7</i>	g.15631G>T, g.18053A>G és g.25505C>T	Feltételezett aktivitás ↑	<2,4
<i>CYP2B6*9</i>	g.15631G>T (4. exon)	mRNS expresszió és aktivitás ↓	<1,47
<i>CYP2B6*18</i>	g.21011T>C (7. exon)	Aktivitás ↓/∅	0
<i>CYP2B6*22</i>	g.-82T>C	mRNS expresszió és aktivitás ↑	1,4-2,4

<sup>a</sup>,<sup>b</sup>PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07), <sup>b</sup>Zanger & Klein, 2013; Zhou & Lauschke, 2022

#### 1.2.5.1.2 A *CYP2B6* fenokonverziója

A *CYP2B6* genetikai variánsai által meghatározott *CYP2B6* expressziót és enzimaktivitást számos *CYP2B6*-specifikus vagy nem *CYP*-specifikus nem-genetikai tényező módosíthatja.

A *CYP2B6* enzimműködés mechanizmus-alapú gátlását számos struktúrálisan eltérő vegyületnél leírták, melyek közül a daganatellenes thiotepát a legszelektívebb *CYP2B6* gátlószernek tartjuk (Pelkonen et al., 2008; Turpeinen & Zanger, 2012). További jól ismert *CYP2B6* szelektív gátlószer a klopidozról és a szertralin, melyek szintén jelentősen csökkentik a *CYP2B6* enzimaktivitást. A fenobarbitál, rifampicin, fenitoin, dexametazon és számos kortikoszteroid a CAR és a PXR nukleáris receptorfehérjék aktiválásával fokozzák a *CYP2B6* transzkripcióját és növelik a *CYP2B6* enzimaktivitást (Pascussi et al., 2000; Turpeinen & Zanger, 2012; Hedrich et al., 2016a). A klinikumban alkalmazott *CYP2B6*-szubsztrát gyógyszerek terápiás hatékonyságát, illetve a mellékhatások megjelenését jelentősen befolyásolhatják *CYP2B6*-szelektív gátló- vagy

indukálószer a CYP2B6 metabolikus aktivitásának módosításával (Huitema et al., 2000; Al Koudsi & Tyndale, 2010; Hakkola et al., 2020). Ezenkívül számos tanulmányban felvetették, hogy a nem olyan belső tényező, mely jelentősen befolyásolhatja a CYP2B6 fenotípust. Nők májmintáiban magasabb CYP2B6 enzimaktivitást, illetve mRNS expressziót írtak le férfiak májmintáiban mért értékekhez viszonyítva (Lamba et al., 2003; Parkinson et al., 2004; Al Koudsi & Tyndale, 2010); továbbá, a propofol és metadon *in vivo* kiürülése magasabbnak bizonyult nőkben (Choong et al., 2013). Nőkben a CYP2B6 mRNS expresszió emelésén keresztül az enzimaktivitás fokozódását egy ösztrogénszint-specifikus szabályozó mechanizmusnak tulajdonítják (Dickmann & Isoherranen, 2013; Chiang et al., 2017; Desta et al., 2021). Azonban, más kutatásokban nem erősítették meg a női nem szerepét a CYP2B6 fokozott működésében (Hofmann et al., 2008; Ilic et al., 2013; Pearce et al., 2016). A CYP2B6 expressziója születés után gyorsan növekszik, és 1 éves kor után állandó szintet ér el a májban, mely arra utal, hogy a CYP2B6 kifejeződése nem mutat korfüggést (Mlakar et al., 2016; Pearce et al., 2016).

A CYP2B6-szelektív gátló-, vagy indukálószer okozta fenokonverzió mellett a májbetegségek (alkohollal-összefüggő, illetve alkohollal-nem-összefüggő), rák és egyéb gyulladással állapotok befolyásolják a betegek gyógyszer-metabolizáló képességét, így hozzájárulhatnak a gyógyszer-metabolizáló enzimek, köztük a CYP2B6 aktivitásának megváltozásához (Shah & Smith, 2015; Klomp et al., 2020).

#### **1.2.5.2 CYP2C19**

A CYP2C családba tartozó CYP gének (*CYP2C9*, *CYP2C19*, illetve *CYP2C8*) a 10. kromoszóma hosszú karján található (Zanger & Schwab, 2013), melyek közül a CYP2C19 enzim szerepe merült fel a ciklofoszfamid biotranszformációjában meghatározó 4-hidroxiláz aktivitása miatt (Chang et al., 1997; Helsby et al., 2010).

A CYP2C19 az egyik legtöbbet kutatott és legjelentősebb gyógyszer-metabolizáló CYP izoenzim. Egyrészt, mert klinikailag is jelentős hatóanyagok metabolizmusában vesz részt, többek között elsődleges katalizátora a legtöbb proton pumpa gátlószer (köztük az omeprazol, pantoprazol), valamint a benzodiazepin diazepam inaktiválásának, melyek esetében egyértelmű farmakogenetikai összefüggéseket írtak le (Bertilsson et al., 1989; Furuta et al., 2004). Másrészt, mert a CYP2C19 változatos kifejeződéséért a májban (1.

táblázat) elsősorban számos teljes enzimfunkció kieséssel, illetve fokozással járó polimorf allélvariáns felelős, melyek előfordulása az egyes etnikumoknál jelentősen eltérő lehet (3. táblázat) (Zanger & Schwab, 2013; Ionova et al., 2020; Botton et al., 2021; Zhou & Lauschke, 2022). A *CYP2C19\*2* allélvariáns előfordulása az ázsiai populációkban a legnagyobb (26,9-32,4%), az afro-amerikai és afrikai populációkban is viszonylag gyakori 15,6-18,1%, míg a kaukázusi populációkban fordul elő legkevésbé (6-15%). A *CYP2C19\*3* és *CYP2C19\*4* allélvariánsok előfordulása sporadikus minden populációban; csupán a *CYP2C19\*3* allél kimutathatósága éri el egyes ázsiai populációkban a 10,2%-ot. A *CYP2C19\*17* allél legkevésbé ázsiai populációkban gyakori (1,3-17%), míg a kaukázusi, afro-amerikai, illetve afrikai populációk közel ötödében kimutatható.

A PharmVar 39 db *CYP2C19* allélvariánst tett közzé [PharmVar *CYP2C19*. (2023/07)]. A *CYP2C19\*2* allélvariánsban található g.19154G>A (rs4244285) nukleotid csere hibás mRNS *splicing* mechanizmust indukálva, míg a *CYP2C19\*3* allélvariánsban (rs4986893, g.17948G>A, W212X) a 212. pozícióban lévő triptofán cseréje stop kodont eredményezve vezet a fehérje képződés teljes megszűnéséhez (de Morais et al., 1994; Botton et al., 2021). A *CYP2C19\*4* allélvariáns által kódolt enzimnél a metionin-valin aminosavcsere a start kodonban (rs28399504, g.1A>G, M1V) a transzlációs mechanizmus gátlásán keresztül vezet a funkcionális enzim kieséséhez (Desta et al., 2002; Botton et al., 2021). Eltérően az előbbiektől a promóter régió g.-806C>T (*CYP2C19\*17*, rs12248560) polimorfizmusa fokozott transzkripciót von maga után, és az emelkedett enzimaktivitás a *CYP2C19* szubsztrátok gyorsabb metabolizmusát eredményezi (Sim et al., 2006; Strom et al., 2012).

A *CYP2C19* fenokonverziójában a gyógyszeres terápiának nagy szerepe van (de Jong et al., 2023; Kiss et al., 2018). Ugyanakkor a nem hatását egyértelműen nem hozták összefüggésbe a *CYP2C19* fenotípusos variabilitásával (Scandlyn et al., 2008). Ezzel ellentétben a *CYP2C19* enzimaktivitása és fehérje szintje egyértelmű korfüggést mutat; gyermekek esetében alacsony és csupán 10-18. életév után közelíti meg a felnőttekre jellemző szintet (Koukouritaki et al., 2004).

3. táblázat: A klinikailag jelentős enzimfunkció-változásért felelős *CYP2C19* allélvariánsok.

<i>CYP2C19</i> allélvariánsok	Nukleotid csere	Aktivitás/Expresszió <sup>a</sup>	Allélgyakoriság (% <sup>b</sup> , kaukázusi populációk) <sup>b</sup>
<i>CYP2C19</i> *2	g.19154G>A (5. exon)	Aktivitás Ø	6,0-15,0
<i>CYP2C19</i> *3	g.17948G>A (4. exon)		<1
<i>CYP2C19</i> *4	g.1A>G		<1
<i>CYP2C19</i> *17	g.-806C>T	mRNS expresszió és aktivitás ↑	21,5-25,0

<sup>a,b</sup> PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07), <sup>b</sup>Zanger & Schwab, 2013; Ionova et al., 2020; Zhou & Lauschke, 2022

### 1.3 A ciklofoszfamid

#### 1.3.1 A vegyület általános jellemzői, felhasználási területe

A nitrogén mustár alkilálószer a kémiai hadviselés szempontjából történelmi jelentőségű mustárgáz vegyületekből eredeztethetők (Highley et al., 2022). Az oxazafoszforin ciklofoszfamid (2H-1,3,2-oxazafoszforin-2-amin) nitrogén mustár típusú alkilálószer, az oxazafoszforin gyűrűt tartalmazó vegyület alkiláló hatásáért a központi nitrogén atomhoz kapcsolt két 2-klóretil oldallánc felel (Emadi et al., 2009; Giraud et al., 2010) (4. ábra). Az oxazafoszforinok (ciklofoszfamid, ifoszfamid, trofoszfamid) közös jellemzője, hogy farmakológiailag inaktív „prodrug”-ok, az „aktív” mustárvegyületek képződését hepatikus CYP enzimek katalizálják kémiai átalakítási reakciók során (Giraud et al., 2010). A ciklofoszfamidból képződő aktív hatóanyag a foszforamid mustár. A ciklofoszfamid jelentős szerepet tölt be változatos egészségügyi problémák kezelésében, elsősorban kombinált terápia részeként daganat eredetű neopláziák kezelésében, továbbá vér-, és csontvelő transzplantáció mobilizáló és kondicionáló ágenseként, valamint autoimmun betegségek immunszuppressziós terápiájában felnőtt és gyermek betegek esetében is (Giraud et al., 2010; Ahlmann & Hempel, 2016).

#### 1.3.2 Hatásmechanizmus

A ciklofoszfamid fejlesztése során a „prodrug” kémiai forma kialakításával igyekeztek elérni a vegyület daganatsejt-specifikusságát, arra alapozva, hogy a tumorsejtekben is

kimutatható aktív CYP enzim tartalom. Azonban, ez az elgondolás pontatlannak bizonyult, mivel a farmakológiailag aktív foszforamid mustár alkiláló hatása révén az emberi szervezet minden szövetében képződhet és a sejtekre nézve toxikus, függetlenül attól, hogy gyorsan osztódó daganatos vagy egészséges sejtek építik fel (de Jonge et al., 2005; Emadi et al., 2009). Fiziológias körülmények között a foszforamid mustár 2-klóretil oldalláncairól a klór atomok lehasadásával reaktív foszforamid aziridinum kationok képződnek, melyek adduktokat képeznek az intracelluláris nukleofil molekulákkal. Az alkilálószernek jellemzően a DNS molekulák szerkezetét módosítják szálakon belüli és szálak közötti kovalens keresztkötéseket kialakításával, így a DNS replikáció leállításán keresztül idézve elő a sejtek apoptózisát. Ugyanakkor ismert, hogy fehérjék, lipidek, illetve RNS és mitokondriális DNS molekulák nukleofil központjával is reakcióba lépnek (Emadi et al., 2009; Highley et al., 2022). A DNS molekulán belül a ciklofoszfamid elsődleges támadáspontja a guanin hetes pozíciójában lévő nukleofil nitrogén atom, de foszfoészter adduktok is képződhetnek (Povirk & Shuker, 1994).

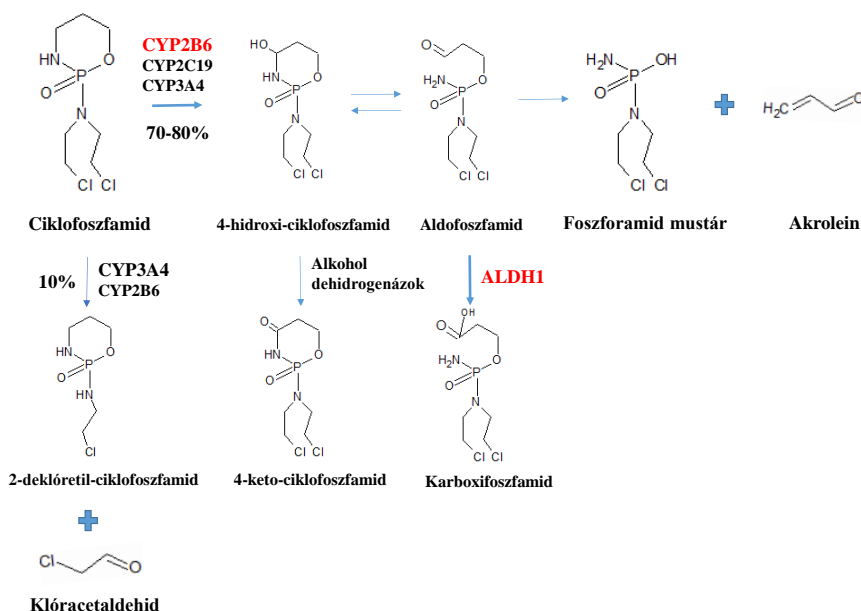
### **1.3.3 A ciklofoszfamid metabolizmusa és az eliminációs útvonalakhoz köthető rezisztencia mechanizmusok**

A ciklofoszfamid dózis kevesebb mint ötödrésze változatlan formában kiválasztódik a szervezetből elsősorban vizeletben és csupán rendkívül kis hányadban székletben vagy a kilélegzett levegőben (Bagley et al., 1973). A ciklofoszfamid hepatikus metabolizmusa egy elsődleges bioaktiválási és számos inaktiválási útvonalra terjed ki (4. ábra).

A ciklofoszfamid 70-80%-a aktiválódik, mely során a ciklofoszfamid oxazafoszforin gyűrűjében a négyes szénatom enzimatikusan hidroxileződik 4-hidroxi-ciklofoszfamiddá. A folyamat elsődleges katalizátora a CYP2B6 enzim, míg a CYP2C19 másodlagos, illetve a CYP3A4 enzimnek is ismert kevésbé jelentős 4-hidroxiláz aktivása. Fiziológias pH-n az instabil 4-hidroxi-ciklofoszfamid és tautomer izomerje az aldofoszfamid kémiai egyensúlyban van, kimutatták, hogy a sejtmembránon keresztül a célsejtekbe diffundálnak. Az aktivált metabolitok önmagukban nem citotoxikusak, csupán az alkiláló hatású metabolit „transzportvegyületeinek” tekinthetők. Az aldofoszfamid spontán kémiai reakció útján bomlik foszforamid mustárra és akroleinre. A fiziológias pH-n ionizált foszforamid mustár számára a sejtmembrán átjárhatatlan, így

csupán az intracellulárisan képződött mustárszármazék tekinthető citotoxikusnak (Domeyer & Sladek, 1980; de Jonge et al., 2005; Giraud et al., 2010).

A hepatociták feleakkora *N*-deklóretiláz aktivitással rendelkeznek, mint 4-hidroxiláz aktivitással, a ciklofoszfamid dózis csupán 10%-a alakul át ezen az útvonalon. A ciklofoszfamid *N*-deklóretilált inaktív metabolitja a 2-deklóretil-ciklofoszfamid, valamint a toxikus klóracetaldehid, mely reakciót a CYP3A4 enzim katalizálja (Huang et al., 2000; de Jonge et al., 2005). Az aktivált 4-hidroxi-ciklofoszfamid és aldofoszfamid metabolitok irreverzibilis inaktíválása CYP enzim-független metabolikus oxidáció, amelyet glutation konjugáció követ. Az aldehid dehidrogenáz (ALDH1A1) a Fázis I. reakciók legjelentősebb eliminálási útvonalának részeként az aldofoszfamidot oxidált karboxifoszfamid metabolitná alakítja át (Dockham et al., 1992; Giorgianni et al., 2000), míg a 4-hidroxi-ciklofoszfamid 4-keto-ciklofoszfamiddá történő biotranszformációját alkohol dehidrogenáz enzimek katalizálják (de Jonge et al., 2005). A Fázis II. folyamatok során a GST enzim a toxikus metabolitok, valamint az anyavegyület *N*-etil láncaira két glutation kapcsolásával konjugált metabolitokat képez, így segítve elő azok eliminálását (Giraud et al., 2010; Highley et al., 2022).



4. ábra: A ciklofoszfamid bioaktivációja, illetve biotranszformációja során képződő metabolitok.

### **1.3.4 A ciklofoszfamid terápia hatékonysága, toxikus szövődményei és a rezisztencia kialakulása**

A ciklofoszfamid citotoxikus, illetve oxidatív stresszt indukáló metabolitjai a terápiás hatás mellett számos klinikailag is jelentős akut és krónikus toxicitást okozhatnak. Az alkalmazott ciklofoszfamid dózisének korlátozása, illetve különböző protektív ágensek együttes terápiaja hatékonyan csökkenti, de nem szünteti meg a toxikus szövődmények kialakulását, utalva a metabolizmusban részt vevő enzimek működésének szerepére a toxikus mellékhatások kialakulásában (de Jonge et al., 2005; Emadi et al., 2009).

A sejtek ciklofoszfamidra mutatott érzékenysége és ennek mértéke sejtípus specifikus, melyet számos molekuláris rezisztencia mechanizmus befolyásol. A ciklofoszfamid kezelésre reagáló sejtekben alacsony ALDH aktivitás tapasztalható, míg a magas ALDH expressziót a ciklofoszfamid rezisztenciával hozták összefüggésbe. Az intracelluláris ALDH1A1 enzim kifejeződése fokozottabb magas osztódási rátájú sejtekben, melyet daganatos és egészséges sejtpopulációk (többek között hepatociták, valamint bélcsatorna nyálkahártyát alkotó sejtek) esetén is leírtak (Jones et al., 1995; Sládek et al., 2002; de Jonge et al., 2005; Emadi et al., 2009; Tomita et al., 2016). Emlőrákos betegekben továbbá kimutatták, hogy a multidrog rezisztencia kialakulásáért felelős BCRP, illetve MRP fehérjék is részt vesznek a koncentráltabban képződő glutation konjugátumok daganatos sejtekből való kiválasztásában. A daganatos sejtekben az ALDH1A1, illetve GST gyógyszer-metabolizáló enzimek kifejeződésének mértékéhez köthető eliminálási mechanizmusok mellett a fokozottan működő DNS-javító folyamatok is hozzájárulnak a ciklofoszfamiddal szembeni rezisztencia kialakulásához (Highley et al., 2022).

A ciklofoszfamid akut toxicitása a foszforamid mustár citotoxikus hatásából fakad, a szervezet gyorsan osztódó normál sejtpopulációkból felépülő egészséges szöveteit károsítja, így a kezelés következtében többek között hajhullás, emésztőszervrendszeri problémák (émelygés, hányás), valamint a nemi szervek károsodása léphet fel. Különösen érzékenyek az alacsony ALDH1A1 expresszióval rendelkező differenciált vérképző progenitor sejtek, a fellépő mieloszuppressziós hatás miatt. A hematopoiotikus sejtgeneráció leukopéniához vezető gátlása viszonylag gyakori ciklofoszfamid kezelés után, azonban az alkalmazott ciklofoszfamid dózisének függetlenül reverzibilis csontvelő elégtelenség léphet fel (Emadi et al., 2009; Jones et al., 1995). A biotranszformációs

útvonal során egy további erősen reaktív, telítetlen aldehid az akrolein képződik, mely a vizeletben felhalmozódva a ciklofoszfamid kezelés egyik leggyakoribb mellékhatását a húgyhólyag vérzéses gyulladását (haemorrhagiás cystitis) okozhatja. Az akrolein által kiváltott oxidatív stressz hatékonyan megelőzhető a mesna (2-merkaptotán-szulfonát) együttes adásával, amely az akroleinnel kölcsönhatásba lépve nem toxikus adduktot képezve eliminálódik a szervezetből (Gupta et al., 2021). Továbbá, szintén az akrolein képződésével hozható összefüggésbe a máj ritkábban előforduló, nagy dózisu ciklofoszfamid terápia által kiváltott véna-elzáródásos betegsége (*veno-occlusive disease*, VOD) (Deleve, 1996; McDonald et al., 2003; de Jonge et al., 2006; MacAllister et al., 2013). A ciklofoszfamid másodlagos inaktivációs útvonala során képződő klóracetaldehid központi idegrendszeri, kardio- és nefrotoxikus hatása ismert, mely hozzájárulhat specifikus szervi diszfunkciók kialakulásához (de Jonge et al., 2005; Benesic et al., 2014). A toxikus aldehid származék által kiváltott mellékhatások azonban ifoszfamid terápiát követően jelentősebbek, mivel az ifoszfamid *N*-deklóretilációja során nagyobb mértékben képződik a toxikus metabolit (Giraud et al., 2010).

Felnőtt betegeknél a ciklofoszfamid terápia kimenetele jól dokumentált (Helsby et al., 2019); azonban gyermekkori malignus betegségben szenvedő betegeknél csupán néhány tanulmány foglalkozott (például Veal et al., 2016; Barnett et al., 2021). A ciklofoszfamid *clearance* intenzívebb gyermekeknél, mint felnőtteknél; továbbá a gyermekek ciklofoszfamidra adott válasza korfüggést mutat, mely alapján korai gyermekkortól egészen a késői gyermekkorig módosított dozírozás szükséges (McCune et al., 2009; Campagne et al., 2020; Barnett et al., 2021). A CYP2B6 autoindukcióját tapasztalták ciklofoszfamid kezelés következtében; magas dózisu mieloablatív ciklofoszfamid kezelést követően csontvelő transzplantáción átesett daganatos gyermekek metabolikus kapacitásának növekedését figyelték meg (de Jonge et al., 2005; Chinnaswamy et al., 2011).

A ciklofoszfamid farmakokinetikai viselkedésében jelentős eltérésekről számoltak be mind daganatos mind immunszuppresszív terápiában részesült betegeknél, gyermekeknél és felnőtteknél egyaránt (Bagley et al., 1973; Yule et al., 1996; McDonald et al., 2003; de Jonge et al., 2006; McCune et al., 2009). Ugyanakkor neuroblasztomával kezelt gyermekeknél nem vizsgálták a ciklofoszfamid metabolizmusához köthető terápiás hatékonyságot és mellékhatás kialakulását. A ciklofoszfamid bioaktiválási útvonalának



kulcsenzimeként a CYP2B6 aktivitása meghatározó mind az aktív foszforamid mustár mind a toxikus metabolitok (akrolein, klóracetaldehid) expozíciójának mértékében, a változatos enzimműködés genetikai és nem-genetikai tényezők együttes következményeként (de Jonge et al., 2005; Giraud et al., 2010). A metabolitok egyénenként eltérő expozíciója jelentősen befolyásolhatja a ciklofoszfamid terápia hatékonyságát, a toxikus mellékhatások megjelenését, illetve a ciklofoszfamid elleni érzékenységének mértékét is (Helsby et al., 2019).

## 2 Célkitűzések

A fenokonverzió a gyógyszer-metabolizáló enzimek genetikailag meghatározott fenotípusának átmeneti megváltozását jelenti, így jelentősen hozzájárulhat a gyógyszeres terápiára adott válasz kialakulására. A CYP2B6 az egyik legtöbb polimorf allélvariánsal rendelkező gyógyszer-metabolizáló CYP enzim, viszont a *CYP2B6* SNV-k és haplotípusok meghatározása nem egyszerű feladat a *CYP2B6* és *CYP2B7P* gének nukleotidszekvenciájának nagymértékű hasonlósága miatt. A CYP2B6 szubsztrát ciklofoszfamid és toxikus metabolitjainak nagyfokú farmakokinetikai variabilitása ismert daganatos gyermekek és felnőttek esetén is, mely befolyásolhatja a betegek ciklofoszfamid terápiára adott válaszát.

- Vizsgálataink megkezdése előtt célunk volt egy PCR (polimeráz lánreakció) alapú, *CYP2B6*-szelektív SNV-kimutatási módszer beállítása és validálása a g.18053A>G (rs2279343) polimorfizmus azonosítására.

Munkám első felében humán májszövet minták felhasználásával a CYP2B6 fenotípust befolyásoló tényezőket igyekeztem feltárni. Célul tűztem ki:

- a májszövet minták *CYP2B6* genetikai variabilitásának jellemzését és a genotipizálás eredményei alapján a *CYP2B6* haplotípusok becslését, valamint a *CYP2B6* genotípus alapján a gyenge, intermedier, normál és gyors fenotípus kategóriák felállítását a PharmVar kritériumrendszerét követve.
- *In vitro* vizsgálataink legfontosabb részeként célunk volt a májszövet minták CYP2B6 fenotípusának (CYP2B6 mRNS expresszió, mikroszomális *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás) kialakításában szerepet játszó genetikai (*CYP2B6* polimorf allélvariánsok) és nem genetikai (CYP-specifikus, valamint nem CYP-specifikus) tényezők azonosítása.

A munka második felében retrospektív analízis során vizsgáltuk neuroblasztómával kezelt betegek ciklofoszfamid terápiáját, amelynek során célunk volt:

- a betegek *CYP2B6* és *CYP2C19* genetikai variabilitásának meghatározása, és fenotípusának becslése a PharmVar kritériumrendszerét követve,
- valamint a ciklofoszfamid terápiát követő mellékhatások (máj és vesefunkció romlás, a vörsejtek számának kóros megváltozása) megjelenése és a CYP2B6 fenotípus összefüggéseinek megállapítása. Másodlagos célkitűzésünk volt a

betegek *CYP2B6* és *CYP2C19* genotípusa, illetve a ciklofoszfamid terápia kimenetele közötti összefüggések megállapítása.

### **3 Anyagok és módszerek**

#### **3.1 Májszövet donorok és betegek**

A vizsgálatokba bevont humán májszövet minták agyhalott donorokból (N=119) származtak a Semmelweis Egyetem Sebészeti, Transzplantációs és Gasztroenterológiai Klinikájáról (Budapest), míg a retrospektív vizsgálatba neuroblasztómával kezelt gyermekeket (N=50) vontunk be, vérmintáikat és klinikai adataikat a Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati Központjától (Budapest) kaptuk. A betegek alacsony vagy magas kockázati besorolása az INSS kritériumai alapján történt (Slavc et al., 1990; Huang & Weiss, 2013). A Gyermekgyógyászati Központ munkatársai az alkalmazott ciklofoszfamid dózisát a betegek testfelülete (testtömeg és magasság) alapján határozták meg standard protokollok elvei szerint, figyelembe véve a kockázati besorolást. A májszövet-donorok, valamint a daganatos gyermekek demográfiai és klinikai adatait a Függelék 3. és 4. táblázata tartalmazza. A vizsgálatokhoz a 18 évnél fiatalabb, neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek törvényes képviselői írásos beleegyezésüket adták. Vizsgálatokat az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (4799-0/2011EKU, 35191-2/2017/EKU) a jelenleg hatályban lévő szabályok betartása mellett (az Egészségügyről szóló 1997 évi CLIV. törvény, az Egészségügyi Minisztérium 23/2002 kiadott rendelet és a Helsinkii Egyezmény).

#### **3.2 Neuroblasztómával kezelt betegek terápiája**

A betegek terápiára adott válaszát, azaz a terápia kimenetelét a Gyermekgyógyászati Központ munkatársai az *International Neuroblastoma Response Criteria* (INRC) elvei alapján határozták meg. A terápiára reagáló betegek közé a teljes, vagy részleges remissziót mutatókat, a nem-reagálók közé stabil, illetve progrediáló betegség vagy elhalálozás esetén soroltuk a betegeket (Park et al., 2017). A májat és a kiválasztószervrendszert érintő károsodást a szérum alanin-aminotranszferáz (GPT), gamma-glutamil-transzferáz (GGT), kreatinin, nátrium és kálium koncentrációjának emelkedése, valamint a véres vizelet megjelenése alapján állapítottuk meg, míg a hematológiai toxicitást a limfociták, neutrofil és eozinofil granulociták, trombociták, monociták és vörösvértestek számának csökkenése jelezte. Ezeket a paramétereket egy

nappal a ciklofoszfamid kezelés előtt és a kezelések utáni 7-15. napon rögzítettük. A *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria* (CTC, verzió 2.0) kritériumrendszert alkalmaztuk a hematológiai, máj, illetve vesetoxicitások mértékének meghatározásához (Függelék 5. táblázat). Toxikus tünetnek tekintettük, ha a szérum paraméterek koncentrációja növekedett vagy a hematológiai paraméterek sejszámai csökkentek az alapszinthez képest, és túllépték a normál referencia tartomány felső vagy alsó határértékét. A referencia tartomány határértékei azonos korú egészséges egyének értékei alapján kerülnek meghatározásra.

### **3.3 Májszövet minták CYP2B6 fenotípusának jellemzése**

Az enzimaktivitás és mRNA expresszió meghatározásokhoz a májszövet minták feldolgozása az explantációt követően azonnal megtörtént. Az *in vitro* CYP2B6 enzimaktivitás meghatározása során felhasznált reagensek és vegyszerek [pl. mefenitoin, acetonitril, glükóz-6-foszfát, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, NADPH, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)] a Merck-től (Darmstadt, Németország), illetve a Reanal Laborvegyszer Kft-től (Budapest) kerültek beszerzésre.

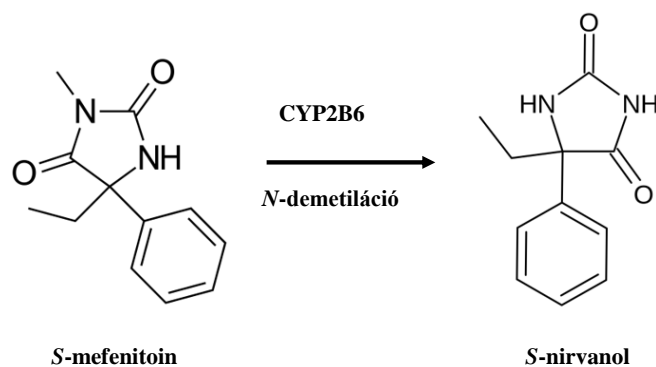
#### **3.3.1 Mikroszóma preparálás**

A májszövetből (kb. 1 g) készített homogenizátumból 1 mM EDTA-t és 154 mM KCl-ot tartalmazó Tris-HCl pufferben (0,1 mM, pH 7,4) mikroszóma frakciót izoláltunk differenciál centrifugálással. A homogenizátum centrifugálása (4°C, 10.000xg, 30 perc) után kapott felülúszóból (S9 frakció) ultracentrifugálással (4°C, 105.000xg, 1 óra) üleptítettük ki a mikroszóma frakciót (van der Hoeven & Coon, 1974). A mikroszóma tisztítását egy újabb ultracentrifugálással végeztük: a mikroszóma frakciót Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk és újból ultracentrifugáltuk (4°C, 105.000xg, 1 óra). A tisztított mikroszóma frakciót Tris-HCl pufferben vettük fel és -80°C-on tároltuk további felhasználásig. Lowry és mtsi által közzétett módszert alkalmaztuk a mikroszóma frakció össz-fehérjetartalmának meghatározásához (Lowry et al., 1951).

#### **3.3.2 CYP2B6-szelektív aktivitás meghatározása**

A máj mikroszóma-preparátumok (N=105) CYP2B6 aktivitásának meghatározásához a CYP2B6-szelektív mefenitoin *N*-demetiláz reakciót alkalmaztuk (5. ábra, Heyn et al., 1996). A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 1) NADPH-regeneráló rendszer (1

mM NADPH, 10 mM glükóz-6-foszfát, 5 mM MgCl<sub>2</sub> és 2 egység/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz), 2) humán máj mikroszóma (fehérjetartalom: 0,8 mg/ml), 3) 1 mM *S*-mefenitoin szubsztrát, 4) 0,1 mM Tris-HCl puffer (pH 7,4). A fenti elegyet 37°C-on inkubáltuk, molekuláris oxigén jelenlétében. Jéghideg acetonitril hozzáadásával állítottuk le a reakciót, melyet centrifugálás követett (4°C, 10.000xg, 10 perc). A felülúszóból az *S*-mefenitoinból képződő nirvanol mennyiségi meghatározását LaChrom ELITE (Merck) HPLC-UV kromatográfiás rendszerrel valósítottuk meg. A kromatográfia során állófázisként a LiChrospher 100-RP-18 125 x 4 mm (5 μm) (Merck) analitikai oszlopot, valamint eluensként ultratiszta víz:acetonitril = 4:1 arányú elegyét alkalmaztuk, a detektálási hullámhossz 220 nm volt. Az *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás adatokat pmól nirvanol/(mg fehérje\*perc)-ben adtuk meg.



5. ábra: A CYP2B6-szelektív *S*-mefenitoin *N*-demetilációja nirvanollá.

### 3.3.3 CYP2B6 mRNS expresszió meghatározása

A májszövet minták (N=84) CYP2B6 mRNS expresszió meghatározásának első lépésében TRIzol reagensben (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) homogenizált májszövet mintákból (~50 mg) totál RNS-t izoláltunk a gyártói útmutató alapján. A 0,1% dietilpirokarbonát tartalmú ultratiszta vízben visszaoldott RNS mintákat -80°C-on tároltuk a további felhasználásig. Az RNS minták (3 μg) reverz transzkripcióját az iScript cDNA synthesis kit-tel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) végeztük el a gyártó protokollja alapján, melyet követően valósidejű PCR során (KAPA Probe Fast qPCR Master Kit™, Merck) határoztuk meg CYP2B6 mRNS mennyiségét a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) *housekeeping* gén expressziójához viszonyítva. A Függelék 6. táblázata tartalmazza a reakcióban alkalmazott oligonukleotidok szekvenciáit, valamint a képződő amplikon hosszát. A g.15631G>T (rs3745274) SNV

jelenlétében aberráns mRNS-variáns íródik át, melyből részben vagy egészen hiányzik a 4.-5.-6. exon, és amely csökkent CYP2B6 mRNS expressziót és enzimaktivitást eredményez (Hofmann et al., 2008). Vizsgálatunkban csupán a teljes hosszúságú CYP2B6 mRNS detektáltuk, mivel az expresszió meghatározásához alkalmazott *forward* és *reverse* primerek a 3. és 4. exonokhoz kötődnek.

### **3.4 CYP haplotípus és genotípus meghatározás**

A genomi DNS templátokat a donorok májszövet mintáiból (N=119), illetve a daganatos gyermekek vérmintáiból (N=50) izoláltuk (Quick-DNA<sup>TM</sup> Miniprep Plus Kit, Zymo Research, Irvine, CA). A CYP2B6 SNV-k meghatározását a donorok májszövet mintáiból, illetve a daganatos gyermekek vérmintáiból izolált genomi DNS templátok felhasználásával végeztük el. Validált TaqMan<sup>TM</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával mutattuk ki a g.-82T>C (rs34223104, C\_27830964\_10), g.15631G>T (rs3745274, C\_7817765\_60) és g.25505C>T (rs3211371, C\_30634242\_40) SNV-eket [Reakció elegy: Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), TaqMan<sup>TM</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific), 10-15 ng genomi DNS minta és nukleáz-mentes víz]. A reakció során a primerek tapadási hőmérséklete 60°C. Azonban, a g.18053A>G nukleotidcsere (rs2279343) meghatározására kereskedelmi forgalomban nem érhetőek el validált primerek és próbák, ezért kétlépéses genotipizálási módszert állítottunk be, mely ötvözi a *nested* PCR, a *touchdown* hőmérsékleti protokoll, valamint a TaqMan PCR módszereit (6. ábra) (Korbie & Mattick, 2008; Green & Sambrook, 2019). Az SNV-kimutatási módszer jellemzőit (alkalmazott oligonukleotidok szekvenciái, a reakciókban képződő ampliconok hossza) a Függelék 6. táblázata tartalmazza. A pre-amplifikációs reakció [tartalma: PCR BIO VeriFi Master Mix (PCR Biosystems Ltd., London, Egyesült Királyság), 400-400 nM *forward* és *reverse* primerek, valamint 40-50 ng genomi DNS templát] hőmérsékleti protokollja: 95°C 1 perc és 10 cikluson keresztül 95°C 15 mp, 72-62°C 15 mp (-1°C/ciklus), 72°C 1 perc, és 10 cikluson keresztül 95°C 15 mp, 62°C 15 mp, 72°C 1 perc. Az SNV-kimutatási reakcióelegy összetétele: Luminaris Probe qPCR Master Mix, 300-300 nM *forward* és *reverse* primerek, 200-200 nM „vad” és „mutáns” TaqMan-próbák, templátként a pre-amplifikációs reakcióban képződő CYP2B6-specifikus amplicon 100-szoros hígításban. A reakció során alkalmazott primer betapadási hőmérséklet: 66°C. A reakció oligonukleotid szekvenciáit az Integrated DNA

Technologies (IDT) Oligoanalyzer™ Tool (2023) és NCBI Nucleotide-BLAST (2023) szoftverek használatával terveztük meg és validáltuk *in silico*; a szekvenciákat a Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Németország) szintetizálta. A reakciókban képződő ampliconok hosszát a TapeStation 4200 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) automata nukleinsav-fragmens analizátorral ellenőriztük. A pre-amplifikáció *CYP2B6*-specifikusságát *CYP2B6*- és *CYP2B7P*-specifikus *forward* primerekkel és egy közös *reverse* primer alkalmazásával ellenőriztük SYBR Green detektálás alapú reakció során. A genotipizálási adatok alapján az egyes *CYP2B6* haplotípusokat (*CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9, illetve *CYP2B6*\*22) a PHASE v2.1.1 szoftver alkalmazásával becsültük (Stephens et al., 2001; Stephens & Scheet, 2005). A haplotípus becslés pontosságának javításához további 44 kaukázusi populációba tartozó egyén *CYP2B6* genotípus adatát (Dobrinás et al., 2013) használtuk fel a donorok és a daganatos gyermekek genotípus adatai mellett. Továbbá, neuroblasztóma betegek esetén a *CYP2C19* g.19154G>A (rs4244285), g.17948G>A (rs4986893), g.1A>G (rs28399504), illetve g.-806C>T (rs12248560) SNV-k és *CYP2C19*\*2, *CYP2C19*\*3, *CYP2C19*\*4, illetve *CYP2C19*\*17 haplotípusok jelenlétét is vizsgáltuk kutatócsoportunk munkatársainak tanulmányában leírtak szerint (Kiss et al., 2018). A *CYP2B6*, valamint *CYP2C19* genotípus alapú fenotípus becslést a CPIC kritériumrendszerei, valamint a PharmVar ajánlásai alapján végeztük el és soroltuk az egyéneket gyenge, intermedier, normál vagy gyors/ultragyors metabolizáló kategóriákba [PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07) PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07), Lee et al., 2022, Desta et al., 2019].

### **3.5 Adatok értékelése**

InStat v3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) szoftver használatával vizsgáltuk a következőket: 1) Májszövet *CYP2B6* fenotípusa és a *CYP2B6* genetikai, illetve nem-genetikai tényezők összefüggései (Kruskal-Wallis-próbát követően Dunn-féle teszt); 2) Fenokonvertáló nem-genetikai tényezők gyakorisága az egyes *CYP2B6* metabolizáló csoportokban (Fisher-féle egzakt próba); 3) Daganatos gyermekeknél kimutatott *CYP2B6* és *CYP2C19* SNV-k lehetséges összefüggései a ciklofoszfamid tartalmú terápia kimenetelével, valamint a ciklofoszfamid-függő toxikus mellékhatások megjelenésével (Fisher-féle egzakt próba; valamint Khí-négyzet próba). IBM SPSS Statistics [v28.0.1.0 (142), IBM Corp., Armonk, NY] szoftvert alkalmaztunk a következőkhöz: 1)



Többváltozós lineáris regressziós analízist hajtottunk végre több modell felállításával a májszövet CYP2B6 aktivitása vagy mRNA expressziójának (függő változó), valamint *CYP2B6* genetikai, és nem-genetikai tényezők (kovariánsok) közötti lehetséges összefüggések vizsgálatára; 2) Bináris többváltozós logisztikus regressziós analízist végeztünk több modell felállításával a daganatos gyermekek ciklofoszfamid terápiára adott válasza (függő változó) és a *CYP2B6* genetikai, és nem-genetikai tényezők (kovariánsok) közötti lehetséges összefüggések vizsgálatára. Az elemzések során a  $P < 0,05$  érték esetén tekintettük a vizsgált összefüggést statisztikailag szignifikánsnak.

## 4 Eredmények

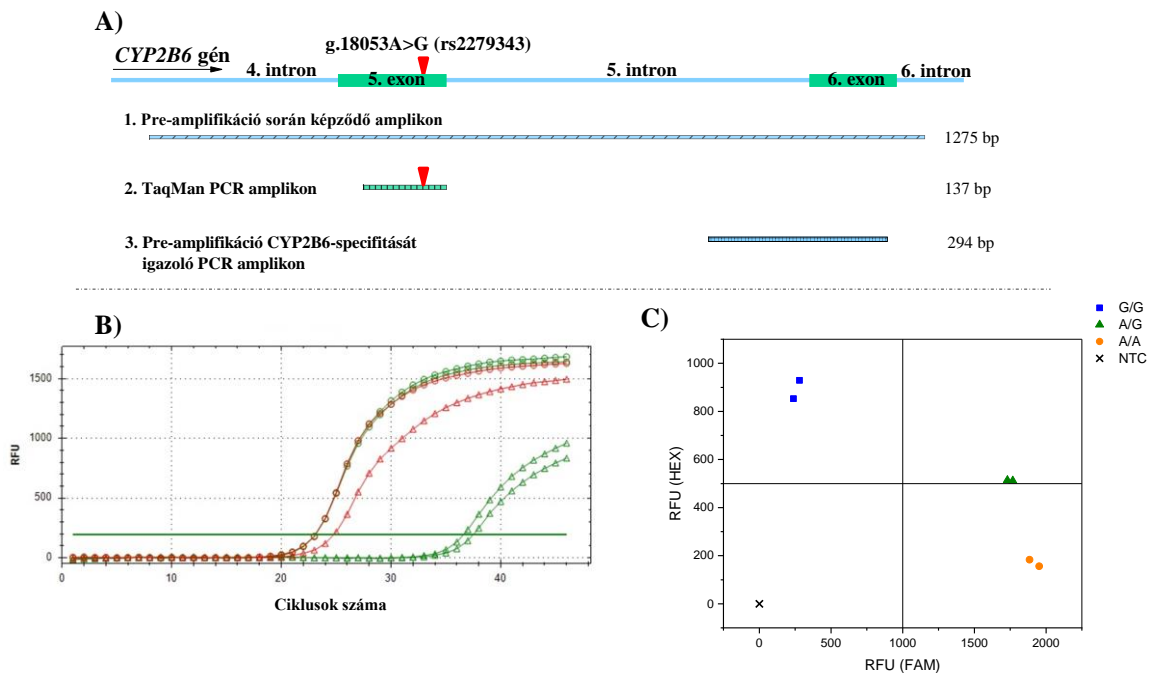
### 4.1 A CYP2B6 fenotípus kialakításában potenciálisan jelentős genetikai és nem-genetikai tényezők

#### 4.1.1 g.18053A>G (rs2279343) SNV meghatározása: PCR alapú módszerfejlesztés

A legtöbb, klinikailag releváns *CYP2B6* SNV azonosítására létezik kereskedelmi forgalomban kapható esszé, azonban a kaukázusi fehér populációban egyik leggyakrabban előforduló SNV, a g.18053A>G meghatározására alkalmas esszé nem elérhető. Munkám során a *CYP2B6* gén (rs2279343) g.18053A>G nukleotidcseréjének azonosítására a *nested* PCR módszeren, a *touchdown* hőmérsékleti protokollon és a TaqMan PCR-en alapuló kétlépéses PCR módszert fejlesztettünk ki (6A. ábra) (Korbie & Mattick, 2008; Green & Sambrook, 2019). Az SNV kimutatási módszer két reakciójában két primer párt alkalmaztunk a módszer *CYP2B6*-specifitásának növeléséhez és a *CYP2B7P* amplifikációjának visszaszorításához (Függelék 6. táblázat). Az első lépésben (a pre-amplifikáció során) alkalmazott primerpár egy viszonylag hosszú (~1275 bp) amplikont hozott létre, amely a *CYP2B6* gén 5. és 6. exonjait tartalmazta, köztük az 5. intronnal, illetve néhány rövid környező *upstream* és *downstream* intron régió szekvenciával (6A. ábra). A *CYP2B6* és *CYP2B7P* intron szekvenciáinak homológiája valamivel alacsonyabb, mint az exonoké (Desta et al., 2021), ezért az első, pre-amplifikációs primerpár kötőhelyét az *upstream* és *downstream* intron régiókra (a 4. és 6. intronra) terveztük. A reakció során a primerek *CYP2B6* génspecifikus hibridizációját a *touchdown* PCR hőmérsékleti protokoll elve alapján biztosítottuk. A hőmérsékleti protokoll első ciklusában a primerek *in silico* megállapított olvadási hőmérsékleténél (62°C) magasabb primer-kötődési hőmérsékletet (72°C) alkalmaztunk, melyet a következő 10 ciklus során ciklusonként 1°C-al csökkentettünk. A *touchdown* protokollt alkalmazva elméletileg ciklusonként négyszeres exponenciális különbség várható a helyes és a nem-kívánt primer-kötődésből fakadó termékképzés között, amely a *CYP2B6*-specifikus amplikon feldúsulását eredményezte az *off-target CYP2B7P*-specifikus termékhez képest (Korbie & Mattick, 2008).

Jacob és munkatársainak módszerét kisebb módosításokkal követve a pre-amplifikáció *CYP2B6*-specifikitásának ellenőrzésére három primert alkalmaztunk: 1) egy *CYP2B6*-specifikus (t5b6\_2) *forward* primert, 2) egy *CYP2B7P*-specifikus (t5b7\_2) *forward* primert és 3) egy közös (t5con\_2) *reverse* primert (Függelék 6. táblázat) (Jacob et al., 2004). A genomi DNS-t vagy a pre-amplifikált DNS-amplikont templátként használva nagy eltérés volt detektálható a *CYP2B6* és *CYP2B7P* specifikus termékek Ct értékei között [(Ct<sub>genomi DNS</sub>: 23,1 és 24,1 vs Ct<sub>DNS-amplikon</sub>: 23,1 és 37,04) (6B. ábra)], mellyel megerősítettük, hogy a pre-amplifikációs reakcióban jelentős mennyiségű (több mint 5000-szeres) *CYP2B6*-specifikus amplikon képződött a *CYP2B7P*-specifikus amplikon mennyiségéhez képest. Összegezve, a *CYP2B6* szelektív SNV-kimutatás templátjaként a *nested* PCR módszerrel létrehozott pre-amplifikált DNS-amplikon alkalmasabb, mint a genomi DNS.

A pre-amplifikált termék 100-szoros hígításban szolgált templátként a második, TaqMan PCR reakcióban. Az SNV kimutatáshoz egy második primerpárt alkalmaztunk, amely egy rövid, ~137 bp-os amplikont hozott létre az 5. exonon az rs2279343 mutációs pontnál, valamint két próbát, a mutációt nem hordozó („vad-típusú”) FAM-jelölt és a mutációt hordozó („mutáns”) allélra tervezett HEX-jelölt TaqMan-próba szekvenciákat (6A. ábra, Függelék 6. táblázat). Az SNV-diszkrimináció pontosságát homozigóta vad (18053A/A), heterozigóta (18053A/G) és homozigóta mutáns (18053G/G) minták felhasználásával Sanger-szekvenálással igazoltuk (6C. ábra, Függelék 1. ábra).



6. ábra: A *CYP2B6* génben található g.18053A>G nukleotidcsere (rs2279343) meghatározási módszerének ismertetése. A) Az ábrán a módszer részét képező pre-amplifikáció és TaqMan PCR, valamint a pre-amplifikáció *CYP2B6*-specifikusságát igazoló PCR reakciókban képződő ampliconok elhelyezkedése és hossza látható. B) A pre-amplifikáció *CYP2B6*-specifitásának ellenőrzése. A reakcióban jelentős mennyiségű *CYP2B6*-specifikus amplicon (a körökkel jelölt amplifikációs görbék) képződött a *CYP2B7P*-specifikus amplicon mennyiségéhez viszonyítva (háromszögekkel jelölt amplifikációs görbék), mely során pre-amplifikált mintákat (zöld amplifikációs görbék) és genomi DNS mintákat (piros amplifikációs görbék) használtunk fel. C) A g.18053A>G (rs2279343) kimutatási reakció SNV-diszkriminációja.

#### 4.1.2 A májszövet donorok *CYP2B6* genotípusa

Humán májszövet mintákban (N=119, Semmelweis Egyetem) meghatároztuk a *CYP2B6* kaukázusi populációban leggyakoribb variánsait [g.-82T>C (rs34223104), g.15631G>T (rs3745274), g.18053A>G (rs2279343) és g.25505C>T (rs3211371) SNV] valós idejű PCR alkalmazásával. A SNV-k alapján a *CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9 és *CYP2B6*\*22 haplotípusokat különítettük el; a g.-82T/15631G/18053A/25505C haplotípust tekintettük *CYP2B6*\*1 „vad-típusú” allélnak. A vizsgált populációban a *CYP2B6*\*6 és a *CYP2B6*\*5 allélok gyakorisága volt a legnagyobb (24,8%, illetve 10,5%), míg a *CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*9 és *CYP2B6*\*22 allélok jelentősen kisebb gyakorisággal fordultak elő (2,1%, illetve 0,8-0,8%) (4. táblázat). A PharmVar *CYP2B6 gene-specific information tables* (2023/07) kritériumai szerint az egyes *CYP2B6* genotípusok alapján a donorok gyenge, intermedier, normál vagy gyors metabolizmussal rendelkeztek. A

szövetdonorok fele normál metabolizálónak bizonyult, *CYP2B6*\*1/\*1 vagy *CYP2B6*\*1/\*5 genotípussal (38,7% vagy 12,6%). Az egy normál és egy csökkent funkciójú *CYP2B6* enzimet kódoló alléllal (*CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9 vagy *CYP2B6*\*4/\*6 genotípusú) rendelkező intermedier metabolizálók alkották a donorok több mint egyharmadát (36,1%). A gyenge metabolizálók közé a mindkét szülőtől öröklötten csökkent funkciójú enzimet kódoló allélt hordozókat soroltuk (*CYP2B6*\*6/\*6 vagy *CYP2B6*\*6/\*9 genotípusú), míg a gyors metabolizálók csoportjába az egy normál és egy emelt funkciójú enzimet kódoló allélokot hordozók kerültek (*CYP2B6*\*1/\*4, *CYP2B6*\*1/\*22 vagy *CYP2B6*\*4/\*5 genotípusú). A gyenge és gyors metabolizálók előfordulási gyakorisága <10% (4. és 5. táblázat).

4. táblázat: *CYP2B6* allél és genotípus gyakoriságok a szövetdonorok májszövet mintáiban és a kaukázusi populációban.

	N <sup>a</sup>	Gyakoriság (%)		Aktivitás/Expresszió <sup>c</sup>
		Szövetdonorok	Kaukázusi populáció <sup>b</sup>	
<b><i>CYP2B6</i> allélok</b>				
*4	5	2,1	2,2-6,2	Aktivitás ↑
*5	25	10,5	9-12,2	mRNS expresszió és aktivitás ↔
*6	59	24,8	7-28,15	mRNS expresszió és aktivitás ↓
*9	2	0,8	0-1,47	mRNS expresszió és aktivitás ↓
*22	2	0,8	1,4-2,4	mRNS expresszió és aktivitás ↑
<b><i>CYP2B6</i> genotípusok</b>				<b>CYP genotípus alapú fenotípus becslés<sup>c</sup></b>
*6/*6	8	6,7	5,4-7,36	Gyenge
*6/*9	1	0,8	<0,8	
*1/*6	32	26,9	22,1-22,9	Intermedier
*5/*6	9	7,6	5,3-7,36	
*1/*9	1	0,8	<1,4	
*4/*6	1	0,8	<2,1	
*1/*1	46	38,7	21,05-24,1	Normál
*1/*5	15	12,6	7,36-11,3	

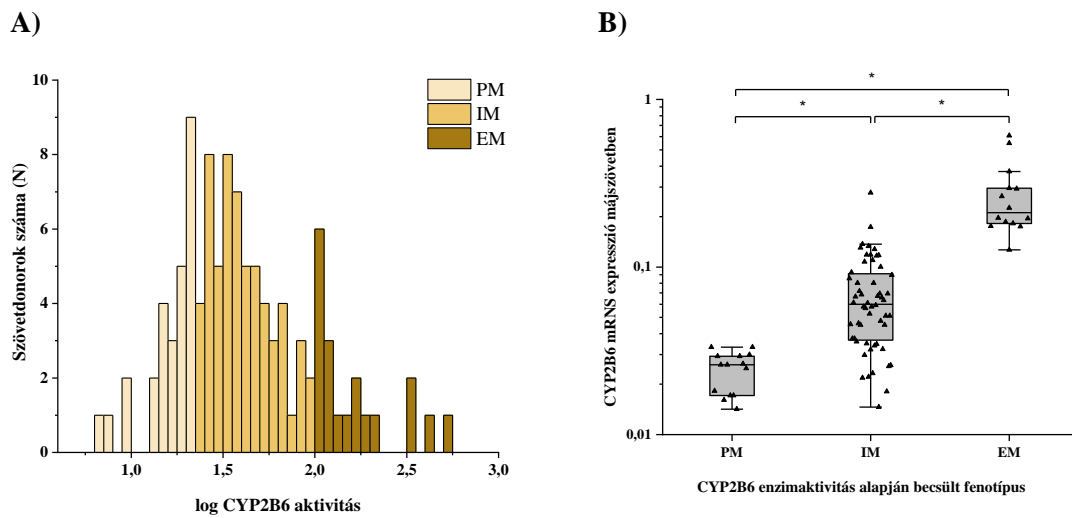
4. táblázat folytatása a 44. oldalról

	N <sup>a</sup>	Gyakoriság (%)		Aktivitás/Expresszió <sup>c</sup>
		Szövetdonorok	Kaukázusi populáció <sup>b</sup>	
*1/*4	3	2,5	1,05-4	Gyors
*1/*22	2	1,7	1,3-2,1	
*4/*5	1	0,8	<0,9	

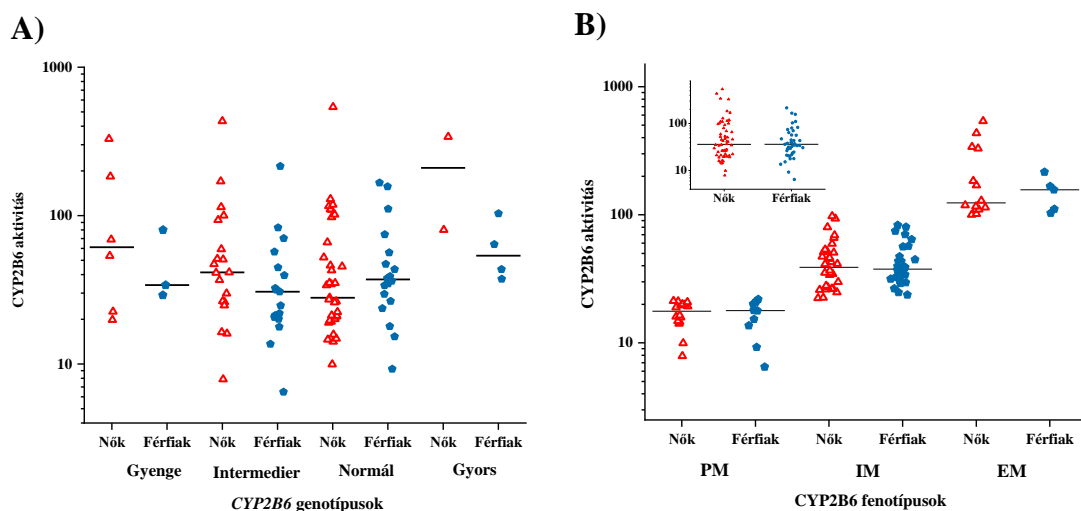
<sup>a</sup>CYP allélok vagy donorok száma, <sup>b,c</sup>Gyakorisági adatok, illetve CYP genotípus alapú fenotípus becslés referenciáit lsd. 2. táblázat lábjegyzetében

#### 4.1.3 A májszövet minták CYP2B6 *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitása és mRNS expressziója

A CYP2B6-szelektív mikroszomális *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitást 105 humán májszövet mintában határoztuk meg. A CYP2B6 aktivitása közel 100-szoros variabilitást mutatott, ahol a minimum érték 6,47 és a maximum érték 538,3 pmól/(mg\*perc) volt, és az adatok pedig aszimmetrikus eloszlást mutattak (7A. ábra). Az alacsony, közepes és magas aktivitások közti határértékek alapján [20 pmól/(mg\*perc) és 99,9 pmól/(mg\*perc)] gyenge (PM), intermedier (IM) és extenzív vagy gyors (EM) metabolizáló csoportokat különítettünk el. A májszövetek CYP2B6 aktivitása és mRNS expressziója szignifikáns összefüggést mutatott (N=84, P<0,0001) (7B. ábra). Ugyanakkor a donorok életkora (Függelék 2. ábra) vagy neme nem befolyásolta a CYP2B6 aktivitást, valamint a férfiak és nők megoszlása az egyes aktivitás vagy genotípus alapú kategóriákban homogénnek bizonyult (8A. és B. ábra).



7. ábra: A) A májszövet minták (N=105) CYP2B6 aktivitás eloszlása (*S*-mefenitoin *N*-demetiláz). B) A máj CYP2B6 enzimaktivitása és mRNA expressziója (N=85) közötti összefüggés vizsgálata az enzimaktivitás alapján becsült fenotípus kategóriák függvényében. \* $P < 0,0001$ , PM gyenge metabolizáló, IM intermedier metabolizáló, EM extenzív vagy gyors metabolizáló



8. ábra: A nem szerepének hozzájárulása a CYP2B6 enzimaktivitáshoz (*S*-mefenitoin *N*-demetiláz) A) a *CYP2B6* genotípus alapján megállapított fenotípus csoportokban, illetve B) CYP2B6 aktivitás alapján meghatározott fenotípus csoportokban. A kiegészítő ábrán a nők és férfiak májszövetében mért aktivitás értékeket tüntettem fel (B).

#### 4.1.4 A CYP2B6 fenotípust meghatározó genetikai és nem-genetikai tényezők

Az irodalmi adatok alapján számos *CYP2B6* allélvariánshoz megváltozott enzimaktivitás köthető (Desta et al., 2021). Továbbá ismert, hogy a g.-82T>C (rs34223104) polimorfizmus fokozott CYP2B6 mRNA expresszióval, míg a g.15631G>T (rs3745274)

nukleotidcsere egy alternatív *splicing* mechanizmus indukálásával csökkenti az mRNA expressziót. A képződő aberráns mRNA-variáns nem tartalmazza a 4.-5.-6. exonokat, így a teljes hosszúságú CYP2B6 mRNA variáns mennyiségi csökkentésén keresztül éri el az enzimaktivitás csökkenését (Zukunft et al., 2005; Hofmann et al., 2008). Azonban a humán májszövet mintákban mért *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás, illetve CYP2B6 mRNA expresszió számos donor esetében nem egyezett meg a *CYP2B6* genotípus alapján várható fenotípussal. Disszertációm jelen alfejezetében a *CYP2B6* genetikai variabilitás és számos nem-genetikai tényező (gyógyszeres terápia, krónikus alkoholfogyasztás, kor, nem) hatásának vizsgálati eredményeit taglalom a máj CYP2B6-szelektív *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitására és mRNA expressziójára. A megfelelő összehasonlítás érdekében egységesítettük az aktivitás (N=105, PM-IM-EM), mRNA expresszió (N=93, alacsony-intermedier-emelkedett) és a genotípus alapú fenotípus kategóriákat (gyenge-intermedier-normál-gyors). A medián aktivitást (36,17 pmól\*mg<sup>-1</sup>\*perc<sup>-1</sup>) küszöbértékként használva az IM fenotípus kategóriát alacsony és magas IM fenotípus alkategóriákra osztottuk fel, melyek megfelelnek az intermedier és normál genotípus alapú fenotípus kategóriáknak (5. táblázat, 9A. ábra).

5. táblázat: *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslés a PharmVar kritériumai alapján, illetve a nem-genetikai tényezők fenokonverziós hatása.

<b><i>CYP2B6</i> genotípus</b>	<b>CYP2B6 fenotípus</b>		<b>Fenokonverzió</b>		
	<i>CYP2B6</i> genotípus alapú becslés <sup>a</sup>	CYP2B6 enzimaktivitás kategóriák	CYP2B6 indukálószer terápia <sup>b</sup>	CYP2B6 gátlószer terápia <sup>c</sup>	nem CYP- specifikus nem- genetikai tényezők <sup>d</sup>
<b>*6/*6</b> <b>*6/*9</b>	Gyenge	PM	IM-EM	PM	PM
<b>*1/*6</b> <b>*5/*6</b> <b>*1/*9</b> <b>*4/*6</b>	Intermedier	alacsony IM	magas IM- EM	PM	PM
<b>*1/*1</b> <b>*1/*5</b>	Normál	magas IM	EM	alacsony IM-PM	alacsony IM-PM



5. táblázat folytatása a 47. oldalról

<b>CYP2B6 genotípus</b>	<b>CYP2B6 fenotípus</b>		<b>Fenokonverzió</b>		
*1/*4 *1/*22 *4/*5	Gyors	EM	EM	magas IM	magas IM

<sup>a</sup>CPIC alapján (Desta et al., 2019); <sup>b</sup>CYP2B6 indukálószer: pl. dexametazon, metilprednizolon, prednizolon, hidrokortizon, kortizon, midazolam, felodipin, diazepam; <sup>c</sup>CYP2B6 gátlószer: pl. amlodipin; <sup>d</sup>nem CYP-specifikus tényezők: krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin+klavulánsav terápia

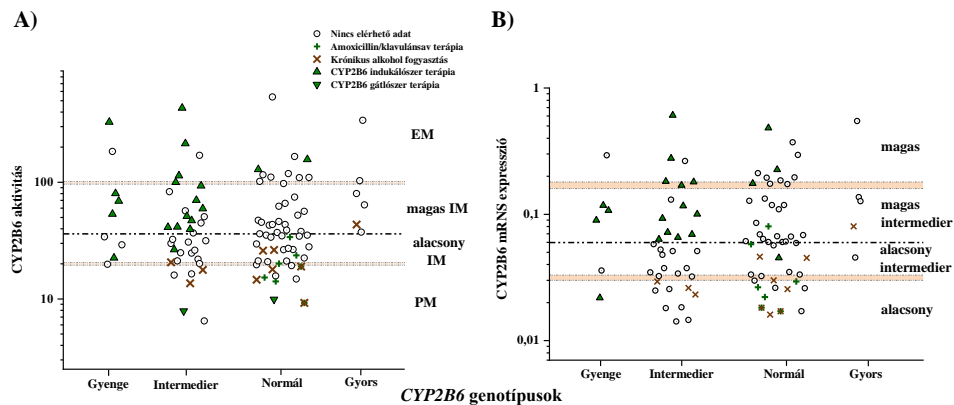
Az mRNA expresszió értékelésénél hasonlóan jártunk el. A medián mRNA expresszió (0,06) alapján az intermedier expresszióval rendelkező donorokat alacsony és magas intermedier mRNA expresszálók közé soroltuk, így feleltetve meg az intermedier és normál genotípus alapú fenotípus kategóriáknak (9B. ábra). A májszövet donorok anamnézisében fellelhető fenokonvertáló nem-genetikai faktorok közé a CYP-specifikus CYP2B6 indukálószer terápia (diazepam, dexametazon, metilprednizolon, felodipin, kortizon, midazolam) és gátlószer terápia (amlodipin), illetve nem CYP-specifikus amoxicillin+klavulánsav terápia és krónikus alkoholfogyasztás tartoztak (Katoh et al., 2000; Pascussi et al., 2000; 't Hoen et al., 2001; Parkinson et al., 2006; Aitken & Morgan, 2007; Vrzal et al., 2010; Ceni et al., 2014; DeLemos et al., 2016; Gao & Tsukamoto, 2016; Štěpánková et al., 2016; Teschke, 2018; Skoda et al., 2020).

#### **4.1.4.1 A CYP2B6 genetikai variabilitás és a nem-genetikai tényezők hatása a máj CYP2B6 S-mefenitoin N-demetiláz aktivitására**

A CYP2B6 genotípus alapján gyenge metabolizáló fenotípusúnak minősített 9 májszövet donor (azaz mindkét alléljukon csökkent funkciójú enzimet kódoló, CYP2B6\*6/\*6 vagy CYP2B6\*6/\*9 genotípussal rendelkező donorok) közül csupán egy mutatott alacsony enzimaktivitást [PM fenotípus, 19,82 pmól/(mg\*perc)]. Alacsony/magas IM vagy EM fenotípus kategóriákba tartozó 5 szövetdonor esetében indukálószer terápia (metilprednizolon, dexametazon, diazepam) magyarázta a megnövekedett CYP2B6 aktivitást (9A. ábra). A genotípus alapján várható intermedier metabolizáló fenotípusú (N=36, CYP2B6\*1/\*6, CYP2B6\*5/\*6, CYP2B6\*1/\*9 vagy CYP2B6\*4/\*6 genotípus) szövetdonorok CYP2B6 aktivitása tág határok között változott [6,47 - 432,7

pmól/(mg\*perc)]. Három szövetdonor PM fenotípusa a kórtörténetükben fellelhető CYP2B6 gátlószer terápia (amlodipin) alkalmazásához vagy a krónikus alkoholfogyasztáshoz volt köthető. Továbbá, a CYP2B6 indukálószer terápia alkalmazása szignifikánsan gyakrabban fordult elő a magas IM/EM aktivitással rendelkező donorok esetében összevetve az alacsony IM fenotípus kategóriákban kimutatható gyakorisági adatokkal (12/18 magas IM/EM vs 1/12 alacsony IM, OR: 22; 95% CI: 2,27-213; P=0,0024) (9A. ábra). A *CYP2B6* genotípus alapján normál metabolizálónak minősített (N=54, *CYP2B6*\*1/\*1 vagy *CYP2B6*\*1/\*5 genotípusú) szövetdonoroknál magas IM fenotípust vártunk, azonban nagymértékű *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás variabilitást tapasztaltunk [9,25 - 538,3 pmól/(mg\*perc)]. Számos PM, illetve alacsony IM fenotípusú donor kórtörténetében az aktivitás csökkenéssel együtt járó gyógyszeres terápia (CYP2B6 gátlószer amlodipin vagy amoxicillin+klavulánsav) alkalmazására találtunk információt, illetve krónikus alkoholfogyasztók is fordultak elő köztük ellentétben a magas IM fenotípusúakkal (12/30 PM/alacsony IM vs 0/14 magas IM, OR: 19,6; 95% CI: 1,07-359,6; P=0,0084). A CYP2B6 EM fenotípus kialakulását csupán az intermedier metabolizáló donorok ötödénél (2/10) magyarázta a metilprednizolon vagy midazolam terápia indukáló hatása (9A. ábra). A *CYP2B6*\*1/\*4, *CYP2B6*\*1/\*22 vagy *CYP2B6*\*4/\*5 genotípust hordozó, várhatóan gyors metabolizáló szövetdonorok (N=6) közül csupán 2 donor (*CYP2B6*\*1/\*4 és *CYP2B6*\*1/\*22 genotípussal rendelkezők) esetében volt kimutatható a genotípus alapján várt EM fenotípus, egy donor esetében a krónikus alkoholfogyasztásnak volt tulajdonítható a magas IM fenotípus [43,41 pmól/(mg\*perc)]. További 3 donor kórtörténetében a genotípus alapján vártnál alacsonyabb aktivitás kialakulásának magyarázatára nem találtunk adatot (9A. ábra).

Összefoglalva, a *CYP2B6* genetikai variabilitás csupán 29 szövetdonor (27,6%) esetében igazolta a máj *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitását. További 35 szövetdonor (33,3%) esetében a CYP2B6 fenotípust a nem-genetikai tényezők befolyásolhatták. Ugyanakkor a donorok 39,1%-ánál (41/105) a kórtörténet nem tartalmazott releváns információt fenokonvertáló nem-genetikai tényezőkről, így megállapíthattuk, hogy a CYP2B6 metabolizáló képesség mértéke a genotípus alapján várt fenotípustól eltér.



Azonosított nem-genetikai faktor/ismeretlen nem-genetikai faktor

Aktivitás	Gyenge	Intermediér	Normál	Gyors
Összes (N)	9	36	54	6
PM	1	3/3	12/18	1/3
Alacsony IM		12	14	
Magas IM	5/3	12/6	2/8	2
EM				

mRNS	Gyenge	Intermediér	Normál	Gyors
Összes (N)	6	33	48	5
Alacsony	1	3/6	11/11	1/3
Alacsony intermediér		10	16	
Magas intermediér	3/2	12/2	3/7	1
Magas				

9. ábra: A máj CYP2B6 enzim aktivitása (A) és mRNS expressziója (B) a donor *CYP2B6* genotípusának függvényében, jelölve a CYP2B6 indukáló- és gátlószer terápiát, amoxicillin+klavulánsav kezelést, krónikus alkoholfogyasztást, mint nem-genetikai tényezőt. A szaggatott vonal a CYP2B6 medián aktivitást, illetve mRNS expressziót jelöli, mely elválasztja a magas és alacsony IM fenotípus kategóriákat. Az ábrák alatti táblázatokban összegzésre kerültek a genotípus alapján becsülhető fenotípus csoportokban beazonosított nem-genetikai tényezők.

#### 4.1.4.2 A *CYP2B6* genetikai variabilitás és a nem-genetikai tényezők hatása a máj CYP2B6 mRNS expressziójára

Két alléljukon csökkent funkciójú enzimet hordozók gyenge metabolizáló fenotípusának tekinthetők (N=6, *CYP2B6*\*6/\*6 vagy *CYP2B6*\*6/\*9 genotípusú) és a májszövetben alacsony CYP2B6 mRNS expressziót várhatunk. Azonban, csupán egy donor májszövetében detektáltunk alacsony mRNS expressziót, ugyanakkor több mint 10-szeres különbség volt megfigyelhető a legalacsonyabb (0,02179) és a legmagasabb (0,2932) CYP2B6 mRNS expresszió között. Négy donor esetében, köztük meglepő módon egy alacsony mRNS expresszióval rendelkezőnél, indukálószer terápiát (diazepam, dexametazon, metilprednizolon) azonosítottunk (9B. ábra). Egy normál és egy csökkent funkciójú enzimet kódoló allélt hordozóknál (N=34, *CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9 vagy *CYP2B6*\*4/\*6 genotípus) az irodalom szerint alacsony intermediér CYP2B6 mRNS expresszió várható, azonban a vizsgált májszövet mintákban nagymértékű, 42-szeres variabilitást tapasztaltunk a legalacsonyabb és a

legmagasabb mRNA expresszió között (0,01418 és 0,60709). Az alacsony mRNA expressziót mutató májszövet mintáknál a donor történetben előfordult alacsony mRNA expresszió kialakulását magyarázó nem-genetikai tényező (alkoholizmus) szemben az alacsony intermedier mRNA expresszióval rendelkezők csoportjával (3/9 az alacsony expressziójúaknál vs 0/11 az alacsony intermedier expressziójúaknál, OR: 12,39; 95% CI: 0,549-279,4; P=0,073). A CYP2B6-specifikus indukálószer (felodipin, kortizon, metilprednizolon) kezelésre utaló adat szignifikánsan gyakrabban fordult elő a magas vagy magas intermedier mRNA expresszióval rendelkező szövetdonorok esetében összehasonlítva az alacsony intermedier mRNA expressziójú mintákkal (12/14 magas/magas intermedier vs 0/11 alacsony intermedier; OR: 115; 95% CI: 4,973–2659,5; P<0,0001) (9B. ábra). Két, normál funkciójú enzimet kódoló allélt hordozók (N=48, *CYP2B6\*1/\*1* vagy *CYP2B6\*1/\*5* genotípusú) várhatóan magas intermedier mRNA expresszióval bírnak, azonban számos, ettől eltérő mRNA expressziójú májszövet mintát találtunk. Az alacsony és alacsony intermedier mRNA expressziójú májszövetek felében az amoxicillin+klavulánsav terápia és/vagy a krónikus alkoholfogyasztás fenokonvertáló hatása magyarázhatja az alacsonyabb mRNA expressziót (11/22 alacsony és alacsony intermedier vs 1/16 magas intermedier; OR: 15; 95% CI: 1,678-134,1; P=0,0051). Három magas mRNA expressziójú szövetdonor kórtörténetében írtak le CYP2B6 indukálószer terápiát (metilprednizolon, midazolam, dexametazon) (3/10 magas expresszió vs 0/16 magas intermedier; OR: 15,4; 95% CI: 0,703–337,5; P=0,0462) (9B. ábra). Habár az egy normál (*CYP2B6\*1*) és egy emelkedett enzimaktivitást kódoló allélt (*CYP2B6\*4* vagy *CYP2B6\*22*) hordozó donorok (N=5) várhatóan a gyors metabolizáló csoportba tartoznak, csupán egy donor májszövetében detektáltunk magas CYP2B6 mRNA expressziót (0,54). Fokozott transzkripciót eredményező hatást jegyeztek fel a *CYP2B6\*22* allélvariáns esetében, azonban az allélt heterozigóta formában hordozó 2 szövetdonor csak magas intermedier CYP2B6 mRNA expressziót mutatott. További 3, *CYP2B6\*1/\*4* genotípusú szövetdonor CYP2B6 mRNA szintje alacsony/magas intermedier, valamint magas expressziójú volt, melyek közül egynél, magas intermedier expressziójú donornál jegyeztek fel krónikus alkoholfogyasztást (0,08) (9B. ábra).

Összefoglalva, 29 májszövet donor mintájában, azaz az összes minta 31,2%-ában a *CYP2B6* genotípus alapján megállapítható CYP2B6 mRNA expresszió igazolható volt. További 33 donor esetében, mely a májminták 35,5%-át jelentette, a donorok

kórtörténetében feljegyzett nem-genetikai tényezők magyarázták a CYP2B6 mRNS expresszió megváltozását. A fennmaradó 31 szövetdonor (33,3%) esetében nem találtunk magyarázatot a genotípus alapján várttól eltérő CYP2B6 mRNS expresszió kialakulására.

#### **4.1.4.3 A CYP2B6 fenotípus kialakulásában releváns genetikai és nem-genetikai tényezők meghatározása többváltozós lineáris regresszióval**

A *CYP2B6* SNV-k, illetve haplotípusok, valamint a CYP2B6-specifikus indukálószer vagy a nem CYP-specifikus amoxicillin+klavulánsav terápia, valamint a krónikus alkoholfogyasztás, mint kovariánsok CYP2B6 aktivitásra és mRNS expresszióra gyakorolt hatásának becslésére többváltozós lineáris regressziós analízist végeztünk (6. táblázat). Első modellünkben a genetikai tényezők és a fenotípus kapcsolatában csupán a CYP2B6 mRNS expressziója és a fenotípus csökkenéssel összefüggésbe hozott *CYP2B6*\*6 allélt jelölő g.- 82T/15631T/18053G/25505T haplotípus között mutattunk ki szignifikáns összefüggést ( $P=0,02$ ). Továbbá igazoltuk, hogy mind az aktivitás/expresszió csökkenést, mind az emelkedést előidéző faktorok meghatározóak a CYP2B6 *S*-mefenitoin *N*-demetilációban, illetve mRNS expresszióban ( $P=0,05$  és  $P=0,006$ , illetve  $P=0,02$  és  $P<0,001$ ). Második modellünkben a g.15631G>T, valamint a g.18053A>G nukleotid szubsztitúciókról mutattuk ki, hogy szignifikáns hatást gyakoroltak a CYP2B6 mRNS expresszióra ( $P=0,004$ , valamint  $P=0,04$ ), azonban az *S*-mefenitoin *N*-demetiláció mértéke csupán a g.15631T SNV jelenlétével mutatott összefüggést ( $P=0,03$ ). A nem-genetikai tényezők közül a legjelentősebbnek a CYP2B6-specifikus indukálószer terápia bizonyult (aktivitás:  $P=0,005$ ; mRNS expresszió:  $P<0,001$ ). A donorok neme egyik modellben sem volt hatással a CYP2B6 aktivitására vagy az mRNS expressziójára.

6. táblázat: A *CYP2B6* SNV-k, haplotípusok, illetve nem-genetikai tényezők (gyógyszeres terápia, alkoholfogyasztás, nem) hatása a *CYP2B6* fenotípusra többváltozós regressziós modellek felállításával.

	Változók	CYP2B6 aktivitás			CYP2B6 mRNS expresszió		
		B koefficiens (SE)	β koefficiens	P	B koefficiens (SE)	β koefficiens	P
1. Modell	<i>CYP2B6</i> *4 (↑) g.-82T/15631G/ <b>18053G</b> /25505C	74,52 (40,75)	0,175	0,07	0,09 (0,05)	0,177	0,07
	<i>CYP2B6</i> *5 (↔) g.-82T/15631G/18053A/ <b>25505T</b>	9,34 (18,65)	0,047	0,62	-0,03 (0,03)	-0,117	0,22
	<i>CYP2B6</i> *6 (↓) g.-82T/ <b>15631T</b> / <b>18053G</b> /25505T	-14,97 (17,53)	-0,090	0,39	-0,05 (0,02)	-0,240	<b>0,02</b>
	<i>CYP2B6</i> *9 (↓) g.-82T/ <b>15631T</b> /18053A/25505C	-46,98 (58,90)	-0,079	0,43	-0,08 (0,07)	-0,111	0,27
	<i>CYP2B6</i> *22 (↑) g.- <b>82C</b> /15631G/18053A/25505C	32,85 (56,52)	0,055	0,56	0,02 (0,07)	0,022	0,82
	Csökkenést okozó faktorok <sup>a</sup>	-41,08 (21,40)	-0,195	<b>0,05</b>	-0,07 (0,02)	-0,236	<b>0,02</b>
	Emelkedést okozó faktor <sup>b</sup>	65,41 (23,29)	0,308	<b>0,006</b>	0,11 (0,03)	0,395	<b>&lt;0,001</b>
	Nem	-17,25 (16,04)	-0,104	0,29	-0,02 (0,02)	-0,073	0,46
Konstans	67,30 (13,70)		<0,00 1	0,12 (0,02)		<0,001	

6. táblázat folytatása az 53. oldalról

	Változók	CYP2B6 aktivitás			CYP2B6 mRNA expresszió		
		B koefficiens (SE)	$\beta$ koefficiens	P	B koefficiens (SE)	$\beta$ koefficiens	P
2. Modell	g.-82T>C (rs34223104)	32,10 (56,79)	0,054	0,57	0,02 (0,07)	0,021	0,82
	g.15631G>T (rs3745274)	-79,98 (38,01)	-0,485	<b>0,03</b>	-0,16 (0,05)	-0,728	<b>0,004</b>
	g.18053A>G (rs2279343)	63,33 (36,59)	0,386	0,08	0,11 (0,05)	0,496	<b>0,04</b>
	g.25505C>T (rs3211371)	8,69 (18,76)	0,044	0,64	-0,04 (0,03)	-0,124	0,19
	Indukálószer terápia	65,90 (22,73)	0,311	<b>0,005</b>	0,11 (0,03)	0,391	<b>&lt;0,001</b>
	Amoxicillin+klavulánsav terápia	-35,03 (28,38)	-0,120	0,22	-0,06 (0,04)	-0,148	0,14
	Alkoholfogyasztás	-33,12 (26,75)	-0,119	0,21	-0,06 (0,03)	-0,174	0,07
	Nem	-15,34 (16,01)	-0,092	0,34	-0,01 (0,02)	-0,052	0,59
	Konstans	67,09 (13,86)		<0,00 1	0,12 (0,02)		<0,001

<sup>a</sup>krónikus alkoholfogyasztás, amoxicillin+klavulánsav terápia, <sup>b</sup>indukálószer terápia

## **4.2 Neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek *CYP2B6* genotípusa és a ciklofoszfamid kezelésük közötti lehetséges összefüggések vizsgálata**

### **4.2.1 A betegek *CYP2B6* és *CYP2C19* genotípusa**

Neuroblasztómával kezelt gyermekek vérmintáinak felhasználásával (N=50, Semmelweis Egyetem) meghatároztuk a klinikailag releváns és a kaukázusi fehér populációban gyakori *CYP2B6* [g.18053A>G (rs2279343), g.15631G>T (rs3745274), g.25505C>T (rs3211371), valamint g.-82T>C (rs34223104)] és *CYP2C19* [g.19154G>A (rs4244285), g.17948G>A (rs4986893), g.1A>G (rs28399504), valamint g.-806C>T (rs12248560)] SNV-eket és haplotípusokat (7. táblázat). Hasonlóan a májszövet minták *CYP2B6* genotípus meghatározásához, a neuroblasztóma betegeknél is a g.- 82T/15631G/18053A/25505C haplotípust tekintettük *CYP2B6*\*1 allélnak, míg a g.- 806C/1A/17948G/19154G haplotípust *CYP2C19*\*1 allélnak azonosítottuk. A *CYP2B6* esetében a leggyakoribb allélok a *CYP2B6*\*6 és a *CYP2B6*\*5 voltak 22,0%-os, illetve 11,0%-os előfordulással, a *CYP2B6*\*4 és *CYP2B6*\*22 allélok csak szórványosan fordultak elő (5,0%, illetve 1,0%), míg a *CYP2B6*\*9 allél egyáltalán nem fordult elő a vizsgálatunkba bevont gyermekeknél. Továbbá, a betegek *CYP2B6* genetikai variabilitása hasonlóan bizonyult a hazai májszövetdonorok *CYP2B6* genetikai diverzitásával (4. és 7. táblázat). A betegeknél a *CYP2C19* allélok közül csupán a *CYP2C19*\*2 és a *CYP2C19*\*17 allél volt azonosítható 15,3%-os, illetve 20,4%-os előfordulással. A *CYP2B6* és *CYP2C19* allélok relatív gyakorisága a betegekben hasonló volt a kaukázusi populációkban megfigyelt előfordulási adatokhoz (7. táblázat) [Zanger & Schwab, 2013, Zanger & Klein, 2013; Ionova et al., 2020; Zhou & Lauschke, 2022; PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07), PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07)]. A *CYP2B6* és *CYP2C19* genotípus alapú enzimfunkció becsléshez a PharmVar és CPIC ajánlásait követtük [Desta et al., 2019; Lee et al., 2022; PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07), PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07)]. A betegek több mint fele (N=30/50) normál/gyors *CYP2B6* metabolizálónak bizonyult, míg 40%-a (N=20/50) a gyenge/közepes *CYP2B6* metabolizálók közé tartozott. A *CYP2C19*\*1/\*1 genotípusú betegeknél (N=23) normál *CYP2C19* metabolizmus várható, míg a *CYP2C19*\*2 allélt homozigóta (*CYP2C19*\*2/\*2) vagy heterozigóta (*CYP2C19*\*1/\*2 vagy *CYP2C19*\*2/\*17)



formában hordozókat tekintettük gyenge/intermedier CYP2C19 metabolizálóknak (N=12/49). A homozigóta (*CYP2C19\*17/\*17*) vagy heterozigóta *CYP2C19\*17* alléllal (*CYP2C19\*1/\*17*) rendelkezőket a gyors/ultragyors CYP2C19 metabolizálókat kategóriájába soroltuk (N=15/49) (7. táblázat). Egy betegnél nem történt *CYP2C19* genotípus meghatározás. A betegek CYP genotípus adatai feltöltésre kerültek PRJEB61781 azonosítóval az EMBL-EBI European Variation Archive (EVA) (Cezard et al., 2022) adatbázisba [EMBL-EVI EVA Association between CYP2B6 genetic variability and cyclophosphamide therapy in pediatric patients with neuroblastoma (2023/05)].

7. táblázat: Neuroblasztómával kezelt betegek (N=50) és a kaukázusi populációban leírt *CYP2B6* és *CYP2C19* allél és genotípus gyakoriságok.

	N <sup>b</sup>	Gyakoriság (%)		Aktivitás/Expresszió <sup>a</sup>
		Neuroblasztóma betegek	Kaukázusi populáció <sup>c</sup>	
<b><i>CYP2B6</i> allélok</b>				
*4	5	5,0	2,2-6,2	Aktivitás ↑
*5	11	11,0	9-12,2	mRNS expresszió és aktivitás ↔
*6	22	22,0	7-28,1	mRNS expresszió és aktivitás ↓
*9	0	0	0-4,4	
*22	1	1,0	1,4-2,4	mRNS expresszió és aktivitás ↑
<b><i>CYP2B6</i> genotípusok</b>				<b>CYP genotípus alapú fenotípus becslés<sup>a</sup></b>
*1/*6	14	28,0	22,1-22,9	<b>Gyenge/intermedier <i>CYP2B6</i> metabolizálók (N=20)</b>
*6/*6	2	4,0	5,4-7,3	
*5/*6	2	4,0	5,3-7,3	
*4/*6	2	4,0	<2,1	
*1/*1	17	34,0	21-24,1	<b>Normál/gyors <i>CYP2B6</i> metabolizálók (N=30)</b>
*1/*5	9	18,0	7,3-11,3	
*1/*4	3	6,0	1-4	
*1/*22	1	2,0	1,3-2,1	

7. táblázat folytatása az 56. oldalról

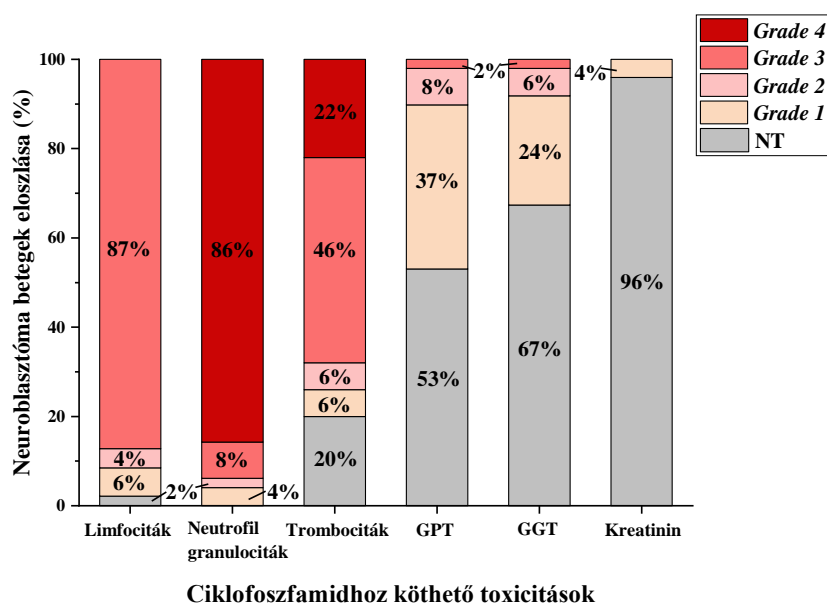
	N <sup>b</sup>	Gyakoriság (%)		Aktivitás/Expresszió <sup>a</sup>
		Neuroblasztóma betegek	Kaukázusi populáció <sup>c</sup>	
<b><i>CYP2C19</i> allélok<sup>c</sup></b>				
*2	15	15,3	6,0-15,0	Aktivitás Ø
*3	0	0	<1	
*4	0	0	<1	
*17	20	20,4	21,5-25,0	mRNS expresszió és aktivitás ↑
<b><i>CYP2C19</i> genotípusok<sup>c</sup></b>				<b>CYP genotípus alapú fenotípus becslés<sup>a</sup></b>
*1/*2	6	12,2	18,3-18,5	<b>Gyenge/intermediér <i>CYP2C19</i> metabolizálók (N=12)</b>
*2/*2	3	6,1	2,1	
*2/*17	3	6,1	6,3	
*1/*1	23	46,9	39,0-40,5	<b>Normál <i>CYP2C19</i> metabolizálók (N=23)</b>
*1/*17	11	22,4	26,9-27,5	<b>Gyors/ultragyors <i>CYP2C19</i> metabolizálók (N=14)</b>
*17/*17	3	6,1	4,6-4,7	

<sup>a</sup>*CYP2B6* és *CYP2C19* genotípus alapján becsülhető fenotípus a PharmVar, illetve CPIC szerint [PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07), PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07); Desta et al., 2019; Lee et al., 2022], <sup>b</sup>CYP allélok vagy betegek száma; <sup>c</sup>Referencia: lásd 2. és 3. táblázat, <sup>d</sup>Egy beteg *CYP2C19* genotípus adata hiányzik

#### 4.2.2 A ciklofoszfamid terápiát követő toxikus mellékhatások megjelenése neuroblasztóma betegeknél

A neuroblasztómával diagnosztizált betegek legalább három cikluson át „alacsony” (1-2,6 mg/ttkg/nap) vagy „közepes” (10,5-38 mg/ttkg/nap) dózisú ciklofoszfamidot tartalmazó terápiás blokkjai alatt összegyűjtött klinikai adatait tekintettük át (Emadi et al., 2009). Az adatok között a ciklofoszfamid-indukálta máj-, vese- és húgyhólyag toxicitásra, valamint mieloszuppresszióra utaló tüneteket kerestük. A toxicitás mértékét a *National Cancer Institute CTC* kritériumrendszere (verzió 2.0) alapján határoztuk meg és összesítettük a 10. ábrán, illetve számszerű adatok a Függelék 5. táblázatban találhatóak. A kritériumrendszer alapján a májfunkció-, illetve vesefunkció romlás a szérumban GPT és

GGT, illetve a szérumban kreatinin koncentrációjának toxikus (a normál tartomány felső határát meghaladó) tartományba emelkedéséből, míg a mieloszuppresszió a limfocita, neutrofil granulocita, valamint trombocita szám kóros (a normál tartomány alsó határa alá) csökkenéséből becsülhető (Függelék 5. táblázat). A vesefunkció megváltozásának értékelésekor továbbá a szérumban nátrium és kálium értékeket is figyelembe vettük, illetve a húgyhólyag toxicitást a véres vizelet tünetének megjelenésével jellemeztük. A hematológiai toxicitás kialakulásában a monocita, eozinofil granulocita, illetve vörösvértestek érzékenységét is vizsgáltuk. Mint a legtöbb kemoterápiás szernél megfigyelhető, a ciklofoszfamid terápiát követően is leggyakrabban hematológiai toxicitás alakul ki, ahogy a vizsgálatunkba bevont betegeknél is tapasztaltuk. A toxicitásra utaló sejtszám csökkenés általában a kezelés utáni 7-15. napon alakult ki összhangban a korábbi tanulmányokban leírtakkal (Fraisier et al., 1991; Langford, 1997; de Jonge et al., 2005). A vizsgált populációban jellemzően *grade 3* limfopénia, *grade 4* neutropénia és/vagy *grade 3/grade 4* trombocitopénia alakult ki, illetve számos betegnél a monociták (39/45), eozinofil granulociták (36/45) és vörösvértestek (39/50) száma is jelentősen csökkent a referencia tartomány alsó értékeihez képest (10. ábra, Függelék 5. táblázat, 10. táblázat). A második leggyakrabban előforduló mellékhatás a májfunkció romlása volt, bár jellemzően enyhe toxicitás volt megfigyelhető (27/49, *grade 1* és *grade 2* vs 2/49, *grade 3*) (10. ábra, Függelék 5. táblázat). A kiválasztószervrendszer érintő mellékhatások enyhék és sporadikusak voltak. A szérumban kreatinin koncentrációja csupán 2 beteg (2/49) esetében érte el a *grade 1* fokozatot, bár a gyermekek 28,6%-ánál (14/49) emelkedett szérumban nátrium és/vagy kálium koncentráció alakult ki. A ciklofoszfamid kezeléshez köthető mellékhatások közül az egyik legjelentősebb a húgyhólyag károsodása (haemorrhagiás cystitis) vizsgálatunkban 3 beteg (3/49) esetén fordult elő, mely a kezelés elején az első vagy második ciklusban jelentkezett és a későbbi ciklusok során nem fordult elő (10. ábra, Függelék 5. táblázat, 8. táblázat).



10. ábra: A ciklofoszfamid terápiát követő toxikus események gyakorisága neuroblasztóma betegeknél a *National Cancer Institute CTC* kritériumrendszere (verzió 2.0) alapján. NT: betegek, akiknél nem fejlődött ki toxicitás. GPT: szérumban alanin-aminotranszferáz. GGT: szérumban gamma-glutamil-transzferáz.

8. táblázat: Máj-, vese- és húgyhólyag toxicitást jelző tünetek gyakorisága a *CYP2B6* genotípus alapján megállapított fenotípus (gyenge/intermedier vagy normál/gyors metabolizáló) csoportokban.

Szervspecifikus toxicitást jelző paraméterek	Gyenge/intermedier <i>CYP2B6</i> metabolizálók	Normál/gyors <i>CYP2B6</i> metabolizálók	P
<b>Májtoxicitás</b>			
<b>GPT</b>	26,3% (5/19)	60,0% (18/30)	<b>0,03</b>
GGT	21,0% (4/19)	40,0% (12/30)	0,21
<b>Vesetoxicitás</b>			
Kreatinin	0,0% (0/19)	6,6% (2/30)	0,51
Nátrium	5,2% (1/19)	6,6% (2/30)	1,00
Kálium	26,3% (5/19)	26,6% (8/30)	1,00
<b>Húgyhólyag toxicitás</b>			
Véres vizelet	0,0% (0/19)	10% (3/30)	0,27

#### **4.2.2.1 A ciklofoszfamid kezeléshez köthető hepatorenális, illetve húgyhólyag toxicitás megjelenése a betegek *CYP2B6* genotípusának függvényében**

Neuroblasztómával kezelt gyermekeknél vizsgáltuk, hogy a *CYP2B6* genotípus alapján becsült fenotípus mutat-e összefüggést a toxicitást kiváltó metabolit (foszforamid mustár, akrolein) képződésnek köszönhető ciklofoszfamid toxicitás (máj-, és vesefunkció romlás és húgyhólyag károsodás) kialakulásával (8. táblázat). A gyenge/intermedier *CYP2B6* metabolizálók negyedénél (5/19, 26,3%) meghaladta a szérum GPT koncentrációja a normál referencia tartomány felső határát, míg a normál/gyors *CYP2B6* metabolizáló betegek több mint felénél figyeltünk meg kóros szérum GPT szint növekedést (18/30, 60,0%). Megállapítottuk, hogy a betegek *CYP2B6* metabolizáló képessége szignifikánsan hozzájárult a ciklofoszfamid kezelést követő májkárosodás kialakulásához (OR: 0,238; 95% CI: 0,068-0,835; N=49, P=0,03) (8. táblázat). A genetikai (*CYP2B6* SNV-kel, haplotípusok), illetve nem-genetikai (kor, nem) tényezők és a szérum GPT szint emelkedés összefüggésének többváltozós logisztikus regressziós analízise megerősítette, hogy a kóros szérum GPT szintek előfordulása szignifikánsan alacsonyabb volt a gyenge/intermedier *CYP2B6* metabolizálóknál, összehasonlítva a normál/gyors metabolizálók esetében előforduló gyakorisági adatokkal (9. táblázat, 2. modell, P=0,02), feltételezhetően a csökkent mRNS expressziót, illetve enzimaktivitást okozó *CYP2B6*\*6 (g.-82T/15631T/18053G/25505T) allélvariáns jelenléte miatt (9. táblázat, 1. modell, P=0,008). Ugyanakkor a 3. modellben vizsgált *CYP2B6* SNV-k, valamint a nem- genetikai tényezők (nem, kor) egyik modellben sem befolyásolták szignifikánsan a GPT szint emelkedését (9. táblázat).

9. táblázat: Toxikus tartományba emelkedett szérumban GPT szintek előfordulása a *CYP2B6* SNV, haplotípus, valamint az életkor (<1,5 év és >1,5 év) és a nem függvényében. A táblázat a többváltozós logisztikus regressziós vizsgálat eredményeit tartalmazza.

	Változók	Növekedett szérumban GPT szint		
		B koefficiens (SE)	Exp β	P
1. Modell	<i>CYP2B6</i> *4 (↑) g.-82T/15631G/18053G/25505C	-0,69 (1,09)	0,49	0,76
	<i>CYP2B6</i> *5 (↔) g.-82T/15631G/18053A/25505T	-1,22 (0,86)	0,29	0,16
	<i>CYP2B6</i> *6 (↓) g.-82T/15631T/18053G/25505T	-1,97 (0,74)	0,13	<b>0,008</b>
	<i>CYP2B6</i> *22 (↑) g.-82C/15631G/18053A/25505C	-23,31 (79461)	7,49E-11	1,00
	Nem	0,21 (0,70)	1,23	0,76
	Kor	0,64 (0,71)	1,89	0,37
	Konstans	25,60 (79461)	1,31E+11	1
2. Modell	Gyenge/intermedier <i>CYP2B6</i>	-1,56 (0,67)	0,21	<b>0,02</b>
	Nem	0,11 (0,65)	1,12	0,86
	Kor	0,60 (0,68)	1,82	0,38
	Konstans	0,60 (0,75)	1,83	0,42
3. Modell	g.-82T>C (rs34223104)	22,33 (40192)	4996498070	1
	g.15631G>T (rs3745274)	0,27 (1,37)	1,31	0,84
	g.18053A>G (rs2279343)	1, (1,39)	0,14	0,16
	g.25505C>T (rs3211371)	-1,39 (0,89)	0,24	0,11
	Nem	-0,47 (0,70)	0,95	0,94
	Kor	0,02 (0,10)	1,02	0,80
	Konstans	-24,39 (40192)	0	1

Meg kell említeni, hogy a szintén májkárosodásra utaló kóros szérumban GGT koncentráció előfordulása nem volt összefüggésben a *CYP2B6* fenotípussal (gyenge/intermedier *CYP2B6* metabolizálók 4/19 vs normál/gyors *CYP2B6* metabolizálók 12/30, OR: 0,400; 95% CI: 0,106-1,502; P=0,21) (8. táblázat). Továbbá a vizsgált betegpopulációban alacsony számban fordult elő kiválasztószervrendszert érintő károsodás, és szignifikáns

összefüggés nem volt kimutatható a CYP2B6 metabolizáló fenotípussal. A szérum nátrium és kálium szintek kóros emelkedésének gyakorisága azonos volt a gyenge/intermedier, valamint normál/gyors CYP2B6 metabolizálók csoportjában (nátrium: 1/19 vs 2/30; OR: 0,778; 95% CI: 0,0656-9,223; P=1,00) (kálium: 5/19 vs 8/30, OR: 0,982; 95% CI: 0,667-3,615; P=1,00). Azonban érdemes megjegyezni, hogy bár sporadikusan fordult elő a húgyhólyag károsodására utaló véres vizelet tünetként (3/49), valamint a vesetoxicitást jelző emelkedett szérum kreatinin koncentráció (2/49), viszont csupán normál CYP2B6 metabolizáló (*CYP2B6\*1/\*1* vagy *CYP2B6\*1/\*5* genotípusú) betegek esetén volt megfigyelhető (8. táblázat).

Összefoglalva, a neuroblasztómával diagnosztizált betegeknél a ciklofoszfamid terápia enyhe májkárosodáshoz vezetett. A májtoxicitás alacsonyabb gyakorisággal fordult elő a gyenge/intermedier CYP2B6 metabolizáló képességű betegek esetében feltehetően a csökkent CYP2B6 enzimaktivitást eredményező *CYP2B6\*6* (g.-82T/15631T/18053G/25505T) allélnak köszönhetően, mely jelentősen hozzájárult a kóros szérum GPT koncentráció előfordulásának csökkenéséhez. A ciklofoszfamid terápiával összefüggő vese- és/vagy hólyagkárosodás nem volt kapcsolatba hozható a betegek CYP2B6 metabolizáló képességével.

#### **4.2.2.2 A ciklofoszfamid kezeléshez köthető mieloszuppresszió megjelenése a betegek *CYP2B6* genotípusának függvényében**

Az emberi szervezet egyes sejtpopulációi, különösen a vérképző sejtek, rendkívül érzékenyek a ciklofoszfamid DNS alkiláló hatására, ezért megvizsgáltuk, hogy a betegek CYP2B6 metabolizáló fenotípusa hozzájárul-e a ciklofoszfamid terápiát követő mieloszuppresszió kialakulásához (10. táblázat). Megállapítható volt, hogy a limfocita, trombocita, neutrofil és eozinofil granulocita, monocita, valamint vörösvértesteket érintő sejtszám csökkenés eltérő gyakorisággal fordult elő a gyenge/intermedier, valamint normál/gyors CYP2B6 metabolizáló betegeknél. Nagymértékű (*grade 3*) limfopénia ritkábban alakult ki a gyenge/intermedier CYP2B6 metabolizálóknál összehasonlítva a normál/gyors CYP2B6 metabolizálókkal (13/18 vs 28/29;  $\chi^2$ : 6,044, N=47, P=0,015). A *grade 3* és *grade 4* trombocitopénia előfordulás hasonlóan magasabb volt normál/gyors CYP2B6 metabolizálóknál, mint a gyenge/intermedier metabolizálók csoportjában (24/30 vs 10/20;  $\chi^2$ : 5,588, N=50, P=0,018). Továbbá a monocita szám csökkenése

szintén összefüggést mutatott a CYP2B6 metabolizáló képességgel (normál/gyors metabolizálók 26/27 vs gyenge/intermedier metabolizálók 13/18; OR: 10,000; 95% CI: 1,056-94,730; N=45, P=0,030). A további sejtpopulációk (neutrofil és eozinofil granulociták, illetve vörösvértestek) sejtszám csökkenése és a betegek CYP2B6 metabolizáló fenotípusa között nem mutattunk ki szignifikáns összefüggést.

Összefoglalva megállapítottuk, hogy a neuroblasztómával kezelt betegek CYP2B6 metabolizáló kapacitása összefüggésbe hozható a ciklofoszfamid terápiát követően egyes sejtpopulációk (limfocita, trombocita, monocita) számának súlyos (*grade 3*, *grade 4*) csökkenésével, így hozzájárulva a hematológiai toxicitás kialakulásához.

10. táblázat: A vérképződés károsodását jelző sejtszám csökkenés előfordulása a gyenge/intermedier, illetve normál/gyors CYP2B6 metabolizáló betegeknél.

	<b>Gyenge/intermedier CYP2B6 metabolizálók</b>	<b>Normál/gyors CYP2B6 metabolizálók</b>	<b>P</b>
<b>Limfociták (N=47)</b>			<b>0,015</b>
<i>Grade 0</i>	5,6% (1/18)	0,0% (0/29)	
<i>Grade 1/2</i>	22,2% (4/18)	3,4% (1/29)	
<i>Grade 3</i>	72,2% (13/18)	96,6% (28/29)	
<b>Trombociták (N=50)</b>			<b>0,018</b>
<i>Grade 0</i>	35,0% (7/20)	10,0% (3/30)	
<i>Grade 1/2</i>	15,0% (3/20)	10% (3/30)	
<i>Grade 3/4</i>	50,0% (10/20)	80,0% (24/30)	
<b>Monociták (N=45)</b>			<b>0,030</b>
>LLN*	27,8% (5/18)	3,7% (1/27)	
<LLN*	72,2% (13/18)	96,3% (26/27)	



10. táblázat folytatása a 63. oldalról

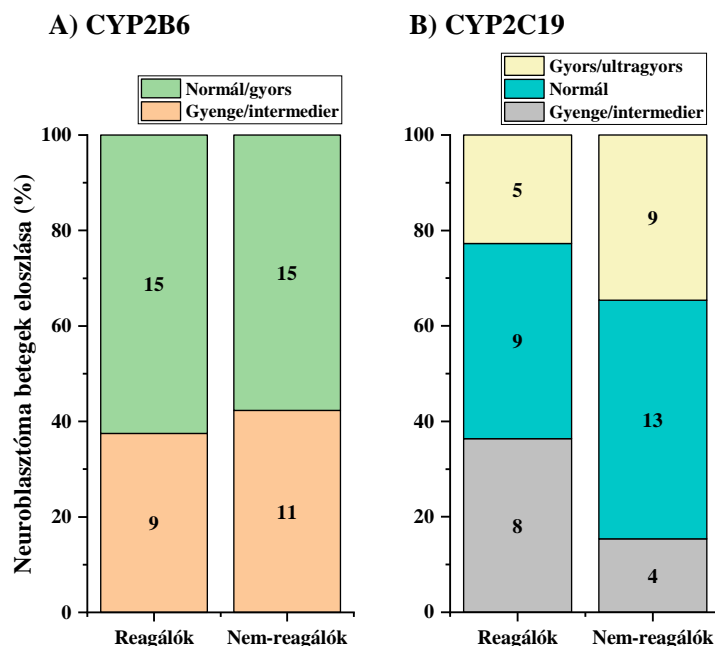
	<b>Gyenge/intermedier CYP2B6 metabolizálók</b>	<b>Normál/gyors CYP2B6 metabolizálók</b>	<b>P</b>
Neutrofilek (N=49)			0,306
<i>Grade 0</i>	0,0% (0/19)	0,0% (0/30)	
<i>Grade 1/2</i>	10,5% (2/19)	3,3% (1/30)	
<i>Grade 3/4</i>	89,5% (17/19)	96,7% (29/30)	
Eozinofilek (N=45)			0,449
>LLN*	27,8% (5/18)	14,8% (4/27)	
<LLN*	72,2% (13/18)	85,2% (23/27)	
Vörösvértest (N=50)			0,489
>LLN*	15,0% (3/20)	26,7% (8/30)	
<LLN*	85,0% (17/20)	73,3% (22/30)	

\*LLN: normál referencia tartomány alsó határértéke

#### **4.2.3 A ciklofoszfamid kezelés kimenetele a betegek *CYP2B6* és *CYP2C19* genotípusa függvényében**

A ciklofoszfamid aktiválásában a CYP2B6 elsődleges szerepet tölt be, míg a CYP2C19 enzimnek másodlagos szerepet tulajdonítanak, így e két enzim aktivitása befolyásolhatja a ciklofoszfamid biotranszformációján keresztül a kezelés hatékonyságát (Helsby et al., 2019). A kemoterápiás kezelésre adott választ, azaz a terápia kimenetelét a vizsgálatba bevont betegek elsődleges tumorválasza alapján határoztuk meg. 24 beteget, akiknél teljes, vagy részleges remisszió volt azonosítható, a kezelésre reagálónak minősítettünk, míg 26 betegre, akiknél a megbetegedés stabil, progrediáló vagy negatív kimenetelű (elhalálozás) volt, a kezelésre nem-reagálónak tekintettünk (Függelék 3. táblázat). Munkám részeként mindkét CYP enzim genotípus alapú gyógyszer-metabolizáló képességét összevetettük a betegeknél tapasztalt terápia kimenetellel a retrospektív analízis során. Azt tapasztaltuk, hogy a különböző CYP2B6 vagy CYP2C19 metabolizáló képességű betegeknél azonos arányban fordultak elő a terápiára reagálók, illetve nem-reagálók (CYP2B6 gyenge/közepes : normál/gyors metabolizálók 9:15 a reagálók és 11:15 a nem-reagálók csoportjában,  $P>0,05$ ; CYP2C19 gyenge/közepes: normál:

gyors/ultragyors metabolizálók 8:9:5 a reagálók és 4:13:9 a nem-reagálók csoportjában,  $P > 0,05$ ) (11. ábra).



11. ábra: A betegek eloszlása a ciklofoszfamid tartalmú kemoterápiára adott válasz szerint az egyes genotípus alapján becsült CYP2B6 (A) és CYP2C19 (B) metabolizáló kategóriákban. A terápiára reagáló csoportba a teljes, valamint részleges remissziót, a nem-reagáló csoportba a stabil és progrediáló betegséget mutató vagy negatív terápia kimenetelű (elhalálozott) betegek tartoztak.

A *CYP2B6* SNV-k és haplotípusok, valamint a nem és az életkor terápia kimenetelre gyakorolt hatását többváltozós logisztikus regresszió analízissel is elemeztük (11. táblázat). Az értékelés során megállapítottuk, hogy a *CYP2B6* genetikai variabilitása nem mutat összefüggést a betegek kemoterápiára adott válaszával, azonban a nem és az életkor (1,5 év alatti és feletti) jelentős mértékben befolyásolta a terápia kimenetelét. Mindkét modell szerint a 1,5 év alatti betegek kedvezőbb terápia kimenetelre számíthattak idősebb társaikhoz képest (1. modell:  $P=0,02$ ; 2. modell:  $P=0,01$ ), illetve a lányok kemoterápiára adott elsődleges tumorválasza kedvezőbb volt, mint a fiúké ( $P=0,03$ ) (11. táblázat).

11. táblázat: *CYP2B6* SNV-k, valamint haplotípusok, illetve a kor és a nem hatásának vizsgálata a ciklofoszfamid tartalmú kemoterápia kimenetelére többváltozós logisztikus regresszió alkalmazásával.

	Változók	Terápiára adott válasz		
		B koefficiens (SE)	Exp $\beta$	P
1. Modell	<i>CYP2B6</i> *4 (↑) g.-82T/15631G/ <b>18053G</b> /25505C	1,39 (1,22)	4,01	0,25
	<i>CYP2B6</i> *5 (↔) g.-82T/15631G/18053A/ <b>25505T</b>	0,52 (0,91)	1,68	0,56
	<i>CYP2B6</i> *6 (↓) g.-82T/ <b>15631T</b> / <b>18053G</b> /25505T	0,73 (0,73)	2,08	0,32
	<i>CYP2B6</i> *22 (↑) g.- <b>82C</b> /15631G/18053A/25505C	-21,99 (40192)	0,00	1,00
	Nem	-1,57 (0,73)	0,20	<b>0,03</b>
	Kor	-1,7 (0,75)	0,18	<b>0,02</b>
	Konstans	21,83 (40192)	30413 54571	1,00
2. Modell	g.-82T>C (rs34223104)	-22,11 (40192)	0,00	1,00
	g.15631G>T (rs3745274)	0,29 (1,47)	1,34	0,83
	g.18053A>G (rs2279343)	0,45 (1,45)	1,58	0,75
	g.25505C>T (rs3211371)	0,38 (0,9)	1,46	0,67
	Nem	-1,5 (0,72)	0,22	<b>0,03</b>
	Kor	-0,75 (0,74)	0,17	<b>0,01</b>
	Konstans	23,31 (40192)	1,338 E+10	1,00

## 5 Eredmények értékelése

A *CYP2B6* genetikai variánsai nagyban hozzájárulhatnak számos, a humán gyógyászatban alkalmazott hatóanyag (antiretrovirális, daganatellenes, antidepresszáns, illetve antimaláriás szerek) farmakokinetikai variabilitásához (Langmia et al., 2021). A *CYP2B6* szubsztrátjai közül kiemelendő a daganatellenes ciklofoszfamid alkilálószer, melyet számos daganatos betegség, köztük a csecsemőket és kisgyermeket érintő neuroblasztóma kezelésében alkalmaznak (Giraud et al., 2010; Matthay et al., 2016). Habár a kaukázusi populációban leggyakoribb *CYP2B6* allélvariánsokról (*CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9, illetve *CYP2B6*\*22) ismert, hogy a *CYP2B6* expresszió és/vagy enzimaktivitás megváltozásával eltérő *CYP2B6* metabolizáló képesség jön létre, egyén-függő (pl. kor, nem) és környezeti (pl. gyógyszeres terápia, krónikus alkoholfogyasztás) nem-genetikai tényezők jelentősen csökkenthetik vagy növelhetik a *CYP2B6* genotípus alapján becsült fenotípust (Shah & Smith, 2015; Desta et al., 2021).

Értekezésem első felében célul tűztem ki a *CYP2B6* genetikai változatosság és számos nem-genetikai faktor hatásának értékelését a *CYP2B6*-szelektív aktivitásra, az *S*-mefenitoin *N*-demetilációra és a *CYP2B6* mRNS expresszióra, valamint a *CYP2B6* genotípus-fenotípus eltérésre humán májszövet mintákban. Ismert, hogy a ciklofoszfamid metabolizmusa során képződő citotoxikus foszforamid mustár, valamint az akrolein és klóracetaldehid toxikus metabolitok klinikailag is jelentős, szervspecifikus károsodásokat idézhetnek elő (de Jonge et al., 2005; Raccor et al., 2012). Másrészt a nitrogénmustár származék képződése a „prodrug” biotranszformációjához kötött, mely folyamatban a *CYP2B6*-nak meghatározó, míg a *CYP2C19* enzimnek másodlagos szerepe van. Következésképpen a *CYP2B6* és *CYP2C19* nagyfokú genetikai variabilitása befolyásolhatja a betegek ciklofoszfamid terápiára adott válaszát, ezáltal a terápia eltérő hatékonyságához, illetve toxikus mellékhatások kialakulásához vezethet (Helsby et al., 2019). Értekezésem második felében neuroblasztómában szenvedő gyermekek adatainak bevonásával (N=50) jellemeztem a ciklofoszfamid bioaktivációja szempontjából releváns CYP enzimek farmakogenetikai tulajdonságait, melyek ismeretében feltehetően igazolható a ciklofoszfamid terápiához kötött toxikus mellékhatások megjelenése és a kedvezőtlen terápia kimenetel alakulása.

## **5.1 A CYP2B6 genetikai variabilitás, illetve az egyén-függő és környezeti nem-genetikai faktorok hozzájárulása a máj CYP2B6 fenotípusához**

A *CYP2B6* genetikai variabilitásának értékelése nem egyszerű folyamat, mivel az allélvariánsok hatásának megfelelő interpretálása mellett már a *CYP2B6* SNV-k kimutatása is technikai nehézségekbe ütközik (Desta et al., 2021). A g.18053A>G nukleotidcsere meghatározására beállítottunk és validáltunk egy kétlépésből álló, a *nested* és *touchdown* PCR technikák, valamint TaqMan-próbák alkalmazásán alapuló kimutatási módszert, amely a *CYP2B7P*-hez nagyon hasonló szekvencia környezetben is képes *CYP2B6*-szelektív SNV azonosításra. A *CYP2B6* allélvariánsok és haplotípusok kimutatási, illetve *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslési módszere beilleszthető kutatócsoportunk munkatársai által kidolgozott CYP-függő személyre szabott gyógyszeres terápia felállítását segítő CYPtest<sup>TM</sup> rendszerbe (Temesvári et al, 2012). A g.-82T>C, g.15631G>T és g.25505C>T polimorfizmusokra tervezett, kereskedelmi forgalomban elérhető PCR esszék, valamint az általunk kifejlesztett g.18053A>G nukleotidcsere kimutatási módszer alkalmazásával azonosított *CYP2B6* SNV-k alapján meghatározhattuk a kaukázusi populációban leggyakoribb és klinikailag releváns *CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9, valamint *CYP2B6*\*22 polimorf allélvariánsokat.

A 119 májszövet mintában kimutatott *CYP2B6* allélvariáns és diplotípus gyakoriságok hasonlóan bizonyultak a kaukázusi populációban leírtakkal [4. táblázat; PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables (2023/07); Zanger & Klein, 2013; Zhou & Lauschke, 2022]. A magyarországi populáció *CYP2B6* genetikai hátteréről csekély információ áll rendelkezésre. Weber és mtsi több száz egészséges magyar önkéntes mintáját (N=431) feldolgozó tanulmányában csupán a g.15631G>T (c.516G>T) polimorfizmust vizsgálták, mely megtalálható többek között a *CYP2B6*\*6, valamint a *CYP2B6*\*9 allélvariánsokban is. A g.15631G>T SNV publikált gyakorisága (21,4%) hasonló volt a vizsgálatunkban (a májszövet mintákban) kimutatott *CYP2B6*\*6 allélvariáns gyakoriságához (28,1%) (4. táblázat; Weber et al., 2015). Eredményeink a *CYP2B6* szélesebb körű genetikai polimorfizmusainak feltárásával tovább bővítik a magyar populáció *CYP2B6* genetikai variabilitásáról eddig szerzett ismereteket.

A humán májszövet minták CYP2B6 fenotípusát a mikroszomális *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás, illetve a CYP2B6 mRNS expresszió alapján értékeltük. A CYP2B6-szelektív enzimaktivitás meghatározásának egyik javasolt enzimreakciója az *S*-mefenitoin próba szubsztrát *N*-demetilációja nirvanollá (Yuan et al., 2002), melyet érdekes módon csupán néhány CYP2B6 genotípus-fenotípus kapcsolatát vizsgáló tanulmányban alkalmaztak (Lang et al., 2001; Lamba et al., 2003; Barber et al., 2020). Ismert, hogy az igen gyakori *CYP2B6*\*6 allélvariánsról a 4.-5.-6. exonokat nem tartalmazó „csonka” mRNS variáns képződése miatt szignifikánsan kevesebb funkcióképes enzimfehérje szintetizálódik (Hofmann et al., 2008). Ezért fontos a CYP2B6 mRNS expresszió mennyiségi meghatározási reakció mRNS variáns-specifitásának biztosítása, melyet vizsgálatunkban a májszövetminták CYP2B6 mRNS expressziója és *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitása között megfigyelt magas korreláció igazolt (6B. ábra).

A májszövet mintákban kimutattuk, hogy a *CYP2B6*\*6 allélvariánsban található g.15631G>T és g.18053A>G polimorfizmusok szignifikánsan befolyásolták (csökkentették) a CYP2B6 mRNS expressziót és/vagy a *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitást, valamint a *CYP2B6*\*6 allélvariánsra jellemző g.-82T/15631T/18053G/25505T haplotípus hozzájárult a CYP2B6 mRNS expresszió csökkenéséhez (6. táblázat). Mindezen megállapításaink megerősítik Hofmann és mtsainak következtetését, miszerint a *CYP2B6*\*6 allélvariáns az mRNS expresszió csökkenésével eredményez alacsony enzimaktivitást a májban (Hofmann et al., 2008). A CYP2B6 enzimaktivitásának csökkenése következésképpen a CYP2B6 szubsztrátok metabolizmusának csökkenésével járhat együtt (pl. efavirenz és bupropion) (Desta et al., 2007; Hofmann et al., 2008; Ariyoshi et al., 2011; Wang et al., 2020). A *CYP2B6* genetikai polimorfizmus jelentősen befolyásolta az efavirenz expozíció mértékét; az efavirenz plazma szint csökkenését írták le *CYP2B6*\*1/\*6, illetve *CYP2B6*\*6/\*6 genotípusú HIV-fertőzött betegeknél, mely alapján az alkalmazott hatóanyag dózisának csökkentését javasolták (Rotger et al., 2007; Desta et al., 2019). A PharmVar *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslés kritériumait [PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07)] alapul véve a CPIC ajánlást fogalmazott meg a *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus meghatározásra, illetve az efavirenz dózis korrekciójára (Desta et al., 2019).

A CYP2B6 fenotípus kialakítására, illetve a CYP2B6 szubsztrátok farmakokinetikai viselkedésére jelentős hatása lehet még a növekedett enzimaktivitással, és/vagy mRNS expresszióval összefüggésbe hozott g.-82T/15631G/18053G/25505C (*CYP2B6\*4*), illetve g.-82C/15631G/18053A/25505C (*CYP2B6\*22*) haplotípusok (Desta et al., 2021). A *CYP2B6* ezen genetikai változatai és a májszövet minták *CYP2B6* fenotípus között azonban nem sikerült összefüggést kimutatni vélhetően az alacsony előfordulás miatt (4. és 6. táblázat). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a bupropion farmakokinetikai viselkedését érdemben kevésbé befolyásolta a *CYP2B6\*6* allélvariáns jelenléte (Kharasch & Crafford, 2019; Kirchheiner et al., 2003). Ismertek olyan *in vitro* és *in vivo* tanulmányok, amelyekben a *CYP2B6* allélvariánsok szubsztrát-specifikus hatását vetették fel. Például a *CYP2B6\*6* allélvariáns ciklofoszfamid biotranszformációjára gyakorolt hatása igencsak ellentmondásos az irodalomban (Xie et al., 2003; Ariyoshi et al., 2011; Raccor et al., 2012). Továbbá PharmVar minősítése alapján emelkedett enzimaktivitást eredményező *CYP2B6\*4* allélvariánsnak alacsony ciklofoszfamid 4-hidroxiláz aktivitást tulajdonítottak összevetve a „vad-típusú” *CYP2B6\*1* allélvariánssal (Ariyoshi et al., 2011; Raccor et al., 2012); míg *in vivo* a *CYP2B6\*1/\*4* genotípusú daganatos betegeknél nem találtak eltérést a 4-hidroxiciklofoszfamid képződés mértékében a *CYP2B6\*1/\*1* genotípusú egyénekhez képest (Shu et al., 2017). A *CYP2B6* genotípus-fenotípus kapcsolatra vonatkozó ellentmondásos eredmények ellenére valószínűsíthető, hogy a *CYP2B6* genetikai variabilitás hozzájárul a *CYP2B6*-szelektív szubsztrátok metabolizmusának egyéni eltéréseihez, így befolyásolva a terápia kimenetelét vagy a toxikus mellékhatások megjelenését (Helsby et al., 2019; Yoon et al., 2020; Packiasabapathy et al., 2021; Eum et al., 2022). Saját eredményeink és az irodalmi ismeretek alapján elmondható, hogy a *CYP2B6* allélvariánsok hatásának interpretálását elősegítheti az egységes genotípus alapú fenotípus kategorizálás alkalmazása, melyhez jó támpontot nyújt a PharmVar által biztosított kritériumrendszer. Munkánk során a kaukázusi populációban leggyakoribb *CYP2B6* allélvariánsok hatását értékeltük, azonban ezeken kívül ismertek még további funkció-módosulással járó ritkábban előforduló allélvariánsok is (pl. *CYP2B6\*7* vagy *CYP2B6\*12*), amelyek nem kerültek azonosításra a májszövet mintákban [PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07)]. A humán májszövet minták kevesebb mint egy harmadánál egyezett meg a *CYP2B6* genetikai variánsok alapján a becsülhető és az *S*-mefenitoin *N*-demetiláció aktivitás,

illetve a CYP2B6 mRNS expresszió alapján meghatározott fenotípus. A májszövet minták több mint 35%-ánál a donorok kórtörténetében rögzített nem-genetikai tényezők járultak hozzá a CYP2B6 fenotípus szignifikáns megváltozásához (9. ábra). Ugyanakkor a májszövet minták közel 30%-ánál nem találtunk magyarázatot a CYP2B6 genotípusból becsülhető fenotípustól való eltérésre, amelyet egyrészt olyan fenokonvertáló nem- genetikai tényezőkkel magyarázhatunk, amelyekre vonatkozóan a szövetdonorok klinikai története nem tartalmazott információt. Másrészt a kaukázusi populációban ritkán előforduló, funkcióváltozással járó genetikai variánsok (pl. *CYP2B6*\*7), amelyeket az SNV analízissel nem azonosítottunk, lehetnek felelősek az eltérő fenotípus megjelenéséért. Ismert, hogy a CYP2B6 enzimaktivitás és expresszió egyének között megfigyelt variabilitása a *CYP2B6* genetikai polimorfizmusa mellett olyan fenokonvertáló nem-genetikai faktoroknak is köszönhető, mint a nem, kor, gyógyszeres terápia, vagy a különféle megbetegedések (Turpeinen & Zanger, 2012; Desta et al., 2021; Langmia et al., 2021). Egyes szerzők kimutatták a nem CYP2B6 működésre gyakorolt hatását, nőknél magasabb CYP2B6 expressziót és aktivitást mutattak ki, mint férfiakban, melyet az ösztrogén-szint által szabályozott hatásnak tulajdonítottak (Lamba et al., 2003; Al Koudsi & Tyndale, 2010; Dickmann & Isoherranen, 2013; Chiang et al., 2017). Azonban más tanulmányokban nem találtak összefüggést a nem és a CYP2B6 fenotípus között, ahogy saját vizsgálatunkban sem tudtuk igazolni a nem CYP2B6 aktivitást befolyásoló hatását (Parkinson et al., 2004; Hofmann et al., 2008; Ilic et al., 2013; Pearce et al., 2016).

A májszövet minták CYP2B6 fenotípusát befolyásoló releváns fenokonvertáló nem- genetikai faktoroknak tekintettük a CYP2B6-specifikus és nem CYP-specifikus gyógyszeres terápiát és a krónikus alkoholfogyasztás miatt kialakult májkárosodást. A szövetdonorok klinikai történetében feltüntetett antibiotikum (amoxicillin+klavulánsav) terápia a szövet/szervkivételt megelőzően a fertőzések megelőzésére szolgált, míg az egyéb hatóanyagok a donorok krónikusan alkalmazott terápiájáról feljegyzett információkból származtak. A *CYP2B6* genetikai variabilitásán túl a CYP2B6-szelektív gátló és indukálószerre fókuszáltunk, melyek átmeneti enzimaktivitás csökkenést, illetve emelkedést idézhetnek elő (Turpeinen & Zanger, 2012; Zanger & Schwab, 2013; Desta et al., 2021; Zhao et al., 2021). A CYP2B6 gátlószer közvetlenül az enzimaktivitásra fejtik ki hatásukat, a kialakult gátlószer-enzim komplex pedig a



mikroszóma-izolálást követően is fennmaradhatott, és a gátló hatás érvényesült az *in vitro* *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitásban is. A CYP2B6 indukálószerrel által megemelkedett mRNS, enzimfehérje szint és aktivitás hozzávetőlegesen 2 hétig is fenn állhat, amely szintén tetten érhető volt a mikroszóma rendszerben is (Sun et al., 2007). A májszövet mintafeldolgozás protokolljának szigorú betartása szükséges ahhoz, hogy reprodukálható, megbízható és összehasonlítható eredményt kapjunk az egyes szövetmintákból a gyógyszeres terápia CYP2B6 fenotípusra gyakorolt hatásáról. Egy normál és egy intermedier CYP2B6 enzimaktivitású májszövet donornál találtunk információt amlodipin terápia alkalmazására, mely magyarázhatta a genotípus alapján becsült fenotípustól való eltérést (alacsony, PM aktivitást) (9A. ábra). A CYP2B6 enzimaktivitás erős gátlószerrei az 1,4-dihidropiridin típusú kalcium csatorna antagonisták, mint az amlodipin (Katoh et al., 2000; Krasulova et al., 2017). Továbbá a májszövet donorok közel egy ötödénél CYP2B6 indukálószer terápiát azonosítottunk (rifampicin, prednisonon, kortizon, hidrokortizon, dexametazon, diazepam, midazolam, felodipin), melyek a CAR és PXR nukleáris receptor fehérjék aktiválásával képesek szabályozni a CYP2B6 transzkripciót és növelni a genotípus alapján megállapítható gyenge, intermedier vagy normál metabolizáló képességet (CYP2B6 mRNS expressziót és *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitást) (Pascussi et al., 2000; 't Hoen et al., 2001; Parkinson et al., 2006; Vrzal et al., 2010; Štěpánková et al., 2016; Skoda et al., 2020). Az egy vagy két, csökkent funkciójú enzimet kódoló allélt hordozó (*CYP2B6*\*6 és/vagy *CYP2B6*\*9 allélvariánssal rendelkező) gyenge vagy intermedier metabolizálóknál számos, a genotípus alapján becsülhető fenotípustól eltérő magas vagy magas intermedier aktivitás és expresszió kialakulása magyarázható volt CYP2B6-specifikus indukálószer terápiával (9A. ábra). Loboz és mtsi egészséges önkénteseken végzett vizsgálatukban bemutatták, hogy a rifampicin indukció emelkedett bupropion kiürülést eredményezett, növelte a hidroxilált bupropion metabolit képződését még a csökkent funkciójú enzimet kódoló *CYP2B6*\*6 allélvariánst hordozóknál is (Loboz et al., 2006). Érdekes megfigyelés, hogy saját vizsgálatunkban a CYP2B6-szelektív indukálószerrel kezelt szövetdonorok 83%-a (19/23) egy vagy két kópiában hordozta a *CYP2B6*\*6 allélvariánst. A rifampicin indukáló hatásának *CYP2B6* genotípus-függő érzékenységét a g.-82T>C polimorfizmus esetén is kimutatták, ugyanis a rifampicin indukció hatására a g.-82C-t hordozóknál az aktivált PXR nukleáris receptor fehérje nagyobb mértékben kötődött a promóter régióhoz

(Li et al., 2010). Érdemes megjegyezni, hogy CYP2B6 gátlószerek esetén is megfigyeltek *CYP2B6* genotípus-függő érzékenységet. A *CYP2B6\*6* allélvariáns például kevésbé volt érzékeny számos gátlószerre (szertralin, klopidozrel), mint a „vad-típusú” *CYP2B6\*1* (Talakad et al., 2009; Xu et al., 2012).

A májszövet mintáknál tapasztalható gyenge vagy intermediér CYP2B6 mRNA expresszió, illetve *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás számos esetben amoxicillin+klavulánsav terápiával és/vagy krónikus alkoholfogyasztással volt kapcsolatba hozható. Az irodalomban nincs információ az amoxicillin+klavulánsav antibiotikum terápia, valamint krónikus alkoholfogyasztás CYP2B6-szelektív enzimaktivitást gátló vagy expressziót csökkentő hatásáról, azonban ismertek májkárosító tényezők, így azt feltételeztük, hogy a károsodás által indukált gyulladási folyamatok módosíthatják a CYP mRNA expressziót és enzimaktivitást (Ceni et al., 2014; Chan & Anderson, 2014; Gao & Tsukamoto, 2016; Teschke, 2018). *In vitro* vizsgálatok igazolták, hogy számos gyógyszer-metabolizáló CYP enzim szuppressziójában meghatározó szerepe van az IL-6, IL-1 $\beta$ , tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) citokineknek és a patogén asszociált lipopoliszacharidoknak (LPS). A gyulladási folyamatok során felszabaduló anyagok hatására a CYP expressziót szabályzó transzkripciós faktorok, mint indukciós mediátorok vagy a konstitutív CYP expressziót befolyásoló hepatocita nukleáris faktorok kifejeződése visszaszorul, illetve a gyulladási folyamatokkal összefüggő miRNA hatására csökken a CYP mRNA stabilitása, amely végül alacsony CYP aktivitást eredményez (de Jong et al., 2020; Stanke-Labesque et al., 2020). Az IL-6 és IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) pro-inflammatorikus citokinekről ismert, hogy szuppresszálják a CYP2B6 mRNA és fehérje expressziót, és a CYP2B6 enzimaktivitás csökkenését idézik elő (Aitken et al., 2006; Dickmann et al., 2011; Klein et al., 2015; Shah & Smith, 2015; Ning et al., 2017).

Humán májszövet mintákon végzett vizsgálatokban kimutattuk, hogy a *CYP2B6* genetikai variabilitás szignifikánsan hozzájárult a CYP2B6 fenotípus kialakulásához (mRNA expresszióhoz és enzimaktivitáshoz), míg a fenokonverziót okozó nem-genetikai faktorok a genetikai faktorokhoz hasonló mértékben eredményezhettek CYP2B6 fenotípus változást, sőt a fenokonverziós hatás el is fedhette a *CYP2B6* allélvariánsok hatását. Al Koudsi és mtsi értékelése szerint a CYP2B6 fehérje expresszió variabilitása csupán tizedrészben volt betudható a *CYP2B6* genotípusnak, további 35%-ban az

indukálószeres és a nem, mint fenokonverziós tényező hatása volt igazolható a fenotípus kialakulásában (Al Koudsi & Tyndale, 2010). Ing Lorenzini és mtsi a CYP enzimek farmakogenetikai hátterének értékelése során viszonylag jó CYP2B6 genotípus-fenotípus egyezést talált a gyenge és gyors metabolizáló betegeknél (67% és 100%), azonban az intermedier metabolizálók csoportjában csak mindössze 38%-ban tapasztaltak egyezést, míg a normál metabolizálóknál a CYP2B6 fenotípust nem lehetett visszavezetni a genotípusra (Ing Lorenzini et al., 2021). Egy retrospektív tanulmányban Rollason és mtsi kimutatták, hogy a krónikus fájdalom kezelése során a gyógyszer-metabolizáló enzimek fenotípusát meghatározó genetikai variabilitás és nem-genetikai faktorok 40%, illetve 28%-ban járultak hozzá a terápia hatástalanságához vagy a mellékhatások kialakulásához (Rollason et al., 2020).

A CYP2B6 fenotípus becslés során a genetikai faktorok mellett szükséges, hogy értékeljük és figyelembe vegyünk a releváns nem-genetikai tényezők hatását is, ezáltal a CYP2B6 genotípus alapú fenotípus becslés közelebb kerülhet a valós fenotípushoz, amellyel a gyógyszeres terápia személyre szabott alkalmazhatósága kiterjeszhetővé válhat az efavirenzen és szertralinon kívül számos CYP2B6 szubsztrát hatóanyagra (pl. ciklofoszfamidra).

## **5.2 A CYP2B6 genetikai variabilitás és a ciklofoszfamid terápia összefüggései neuroblasztómával kezelt gyermekeknél**

A neuroblasztóma a leggyakoribb gyermekkori, koponyán kívüli, szolid daganatos megbetegedés (Steliarova-Foucher et al., 2017; Georgakis et al., 2018), amelynek gyógyszeres terápiájában kockázati besorolástól-függetlenül szerepel a ciklofoszfamid alkilálószer (Meany, 2019; Qiu & Matthay, 2022). Az irodalomban mégse található a ciklofoszfamid biotranszformációjában jelentős CYP2B6 és CYP2C19 enzimek működésének és a ciklofoszfamid-indukálta mellékhatások megjelenése vagy a ciklofoszfamid kezelés kimenetele közötti kapcsolatot értékelő vizsgálat neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek bevonásával. A ciklofoszfamid biotranszformációjában releváns CYP enzimek genetikai polimorfizmusai és a ciklofoszfamid terápia közötti kapcsolatot vélhetően elsőként vizsgáltuk neuroblasztómával kezelt gyermekeknél. A vizsgálatba bevont betegek kezelése előre rögzített protokoll szerint történt az alacsony és magas kockázati besorolás alapján. Az

egy CYP2B6 és CYP2C19 metabolizáló csoportokban az alacsony és magas kockázati besorolású betegek aránya azonos volt. Eredményeink értékeléséhez más daganatos megbetegedéssel diagnosztizált (pl. B-sejtes non-Hodgkin limfóma, illetve központi idegrendszeri daganatos megbetegedések) vagy csontvelőtranszplantációt megelőző, ciklofoszfamid-kezelt, elsősorban felnőtt betegeken végzett vizsgálatok tapasztalatait használtuk fel (pl. McDonald et al., 2003; de Jonge et al., 2006; Veal et al., 2016; Campagne et al., 2020).

Daganatos felnőtt betegeknél a daganatellenes és szupportív gyógyszeres terápia során gyakoriak a súlyos kimenetelű gyógyszer-kölcsönhatások, melyek kialakulásában számos gyógyszer-metabolizáló enzim (köztük CYP enzimek is), illetve transzporter genetikai hátterének jelentőségét emelték ki. Azonban daganatos gyermekek esetén korlátozottan állnak rendelkezésre farmakogenetikai vizsgálati eredmények, így a saját vizsgálataink értékelésében a felnőttekre vonatkozó eredmények lehetnek segítségül (Mlakar et al., 2016; Shugg et al., 2022). A ciklofoszfamid metabolizmusában elsődleges szerepet játszó CYP2B6 és a másodlagos szerepet betöltő CYP2C19 enzimek felelősek az aktív és számos toxikus metabolit (foszforamid mustár, akrolein, klóracetaldehid) képződéséért, így az enzimek genetikai variabilitása és expressziójának mértéke hozzájárulhat a ciklofoszfamid terápiára adott válasz, illetve a ciklofoszfamid által indukált toxikus mellékhatások megjelenésében megfigyelt egyéni különbségekért (de Jonge et al., 2005; Helsby et al., 2019). A gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimek expressziós mintázata nem feltétlenül azonos gyermek és felnőttkorban (Hines, 2008). Míg a CYP2B6 expresszió születés után gyorsan emelkedik és 1 éves korra eléri a felnőttekre jellemző mértéket, addig a CYP2C19 enzim kifejeződése gyermekekben alacsony és csak 10-18 éves korra éri el a felnőtt szintet. Ezért gyermekeknél a CYP2B6 enzimaktivitás kerül előtérbe a ciklofoszfamid metabolizmusában, míg a CYP2C19 amúgy is másodlagos szerepe teljesen elhanyagolhatónak tekinthető.

Humán májszövet mintákkal végzett *in vitro* vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a CYP2B6 fenotípusos megjelenését a genetikai háttér mellett számos nem-genetikai tényező, így a gyógyszeres terápia vagy az alkoholfogyasztás által indukált májkárosodás módosíthatja, míg a kor, illetve a nem szerepe nem jelentős. Fontos megjegyezni, hogy az *in vitro* vizsgálatok 18 év feletti donorok májszövet mintáin történtek, míg a

neuroblasztóma betegek életkora átlagosan 2,3 év volt (0,1-15,8 év). Másrészt ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre a nem és a CYP2B6 fenotípus kapcsolatára vonatkozóan (pl. Lamba et al., 2003; Parkinson et al., 2004; Hofmann et al., 2008; Al Koudsi & Tyndale, 2010; Ilic et al., 2013; Pearce et al., 2016), ezért értékeltük az életkor és a nem hatását is a ciklofoszfamid okozta mellékhatások kialakulására. A neuroblasztómával kezelt gyermekek többkomponensű gyógyszeres terápiája esetlegesen tartalmazhat CYP enzimaktivitást növelő, illetve gátló hatóanyagokat is, így hozzájárulva a gyógyszer-kölcsönhatások kialakulásához. Az elsősorban CYP2B6-specifikus CAR nukleáris receptor aktiválása nyomán kialakuló indukciós folyamatok a ciklofoszfamid biotranszformációját növelhetik a CYP2B6 transzkripciójának fokozásával. Daganatos sejt és hepatocita ko-kultúrákban leírták, hogy a CYP2B6 indukciójával a ciklofoszfamid daganatsejtekre gyakorolt citotoxicitása emelkedett, így a kezelés hatékonysága növekedett (Hedrich et al., 2016b; Stern et al., 2022). Hasonlóan leukemia-hepatocita kokultúrában, a CAR aktiváció fokozta a ciklofoszfamid bioaktiváció mértékét, így az aktív metabolit képződését, ezáltal ciklofoszfamid daganatellenes hatásának fokozódása volt megfigyelhető (Wang et al., 2013). A CYP enzimek fenokonverzióját kialakító tényezők közül gyermekek esetében a krónikus alkoholfogyasztás következtében kialakuló májkárosodás nem tekinthető releváns tényezőnek. Úgyszintén a gyógyszeres terápiát nem tekintettük külön tényezőnek a multivariancia analízis során, mivel nem vagyunk birtokában a betegek kiegészítő gyógyszeres terápiáját képező hatóanyagoknak. Vet, illetve Lenoir és mtsi összefoglaló tanulmányukban kifejtették, daganatos (pl. akut limfoid leukémia) és nem-daganatos (pl. láz vagy szepszis) megbetegedések során kialakuló gyulladás jelentősen hozzájárulhat a gyógyszer-metabolizmus, így a gyógyszeres terápiában alkalmazott hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének megváltozásához nemcsak felnőttek, de gyermekek esetén is (Vet et al., 2011; Lenoir et al., 2021). Ugyanakkor nem találtam arra vonatkozó irodalmi adatot, hogy neuroblasztómával diagnosztizált betegek gyógyszer-metabolizáló kapacitásának megváltozása összefüggésben lehet-e a daganatos megbetegedés indukálta gyulladásos folyamatokkal. Mindezek alapján a ciklofoszfamid terápia hatékonyságának és a ciklofoszfamidhoz köthető mellékhatások értékelése során elsősorban a neuroblasztóma betegek *CYP2B6* genetikai variabilitására fókuszáltunk, továbbá áttekintettük a betegek életkorának és nemének hatását is.

A betegeknél a ciklofoszfamid terápiát követően májfunkció romlás, a vér alakos elemek képződésének visszaszorulása, illetve a kiválasztószervrendszert érintő toxikus mellékhatásokra utaló tünetek (vesefunkció romlás, illetve haemorrhagiás cystitis) jelentek meg. A ciklofoszfamid metabolitok további lebontási útvonalát és a toxikus metabolitok hatástalanítását az aldehid dehidrogenáz enzimek (ALDH) katalizálják, így a szervezet sejtjeinek ciklofoszfamid érzékenysége a sejtek aldehid dehidrogenáz (ALDH) enzim koncentrációjának függvénye. A magasabb ALDH1A1 és ALDH3A1 enzim szintekkel rendelkező sejtekben a foszforamid mustár prekursorának számító aldofoszfamid átalakítási rátája magasabb, így kevésbé érzékenyek a ciklofoszfamid alkiláló hatására (Emadi et al., 2009). A hepatociták magas ALDH koncentrációval rendelkeznek, így kevésbé érzékenyek a ciklofoszfamidra (Jones et al., 1995), mely magyarázhatja a neuroblasztóma betegek esetén megfigyelt jellemzően enyhe mértékű májkárosodás megjelenését (10. ábra, Függelék 5. táblázat). Májfunkció romlást jelző szérumban GPT, GGT, bilirubin és alkalikus foszfatáz paraméterek koncentrációjának átmeneti emelkedését más szerzők is megfigyelték ciklofoszfamid terápiát követően, eredményeinkhez hasonlóan enyhe és/vagy sporadikus májkárosodást írtak le Huitema, illetve Barnett és mtsi (Huitema et al., 2002; Ekhart et al., 2008; Ali et al., 2018; Ming et al., 2019; Barnett et al., 2021). Hematopoetikus progenitor, illetve limfocita sejtekben az ALDH enzim alacsony mértékben fejeződik ki; az alacsony inaktivációs ráta miatt ezek a sejtek érzékenyebbek a ciklofoszfamidra, így nagyobb mértékű vérképzőszervi károsodás kialakulása várható a ciklofoszfamid kezelést követően (Kastan et al., 1990; Jones et al., 1995; McCowage et al., 2011), mely összhangban van a vizsgálatunkban megfigyeltekkel (10. ábra, Függelék 5. táblázat). Eredményeinket alátámasztja, hogy ciklofoszfamid terápián lévő japán emlődaganatos betegek közel felénél, míg egyéb daganatos megbetegedéssel rendelkező gyermekek 12-48%-ában alakult ki jellemzően nagyobb mértékű vérképzőszervi toxicitás (Barnett et al., 2021; Nakajima et al., 2007). A ciklofoszfamid kezelés egyik legismertebb toxikus mellékhatása a haemorrhagiás cystitis, illetve vesefunkció romlás ritkán alakult ki ciklofoszfamid terápiát követően vizsgálatunkba bevont neuroblasztóma betegeknél, melyet más tanulmányok is alátámasztottak (10. ábra, Függelék 5. táblázat, 8. táblázat, Huitema et al., 2002; Ekhart et al., 2008; Veal et al., 2016; Ali et al., 2018; Harahap et al., 2020).

Vizsgálatunk elsődleges célja volt, hogy becsüljük a betegek *CYP2B6* genetikai variabilitásának hozzájárulását a ciklofoszfamid terápiát követő májfunkció romlás, vérképzőszervi toxicitás, illetve kiválasztószervrendszert érintő (vesefunkció romlás, illetve haemorrhagiás cystitis) toxicitás kialakulásához. Kimutattuk, hogy neuroblasztóma betegek *CYP2B6* genetikai polimorfizmusa, így a *CYP2B6* metabolizáló képessége szoros összefüggésben van a ciklofoszfamid terápiát követő májfunkció romlással, valamint a sejttípus-specifikus vérképzőszervi toxicitás megjelenésével. Azonban, a betegek *CYP2B6* genetikai variabilitása nem járult hozzá a kiválasztószervrendszert érintő károsodások kialakulásához (8. táblázat). Egy kínai emlődaganatos betegnél kialakult nagymértékű májkárosodást a *CYP2B6*\*7 allélvariáns jelenléte miatti magas bioaktivációs rátának és az *ALDH3A1* enzim polimorfizmusa következtében csökkent mértékű lebontásnak tulajdonították (Ming et al., 2019). Campagne és mtsi szintén a magas ciklofoszfamid 4-hidroxiláz aktivitáshoz köthették a hematológiai toxicitás fokozottabb kialakulását agydaganatos gyermekek bevonásával végzett vizsgálatukban (Campagne et al., 2020). Továbbá, japán daganatos betegeknél tapasztalható neutropénia (*grade 4*), illetve leukocitopénia megjelenése szignifikáns összefüggésben volt a magas 4-hidroxiciklofoszfamid expozícióval, míg a *CYP2B6*\*6 allélvariánst hordozóknak kevésbé alakult ki *grade 4* neutropénia (Nakajima et al., 2007; Tsuji et al., 2016). Ugyanakkor más tanulmányokban nem mutattak ki szignifikáns összefüggést a máj- vagy vérképzőszervi toxicitás megjelenése, illetve a ciklofoszfamid és metabolitjainak farmakokinetikája vagy *CYP2B6* SNV-k között (McDonald et al., 2003; Haroun et al., 2015; Labib et al., 2016; Veal et al., 2016; Campagne et al., 2020). Egy tanulmányban a magas dózisú ciklofoszfamid terápiát követően mutattak ki kapcsolatot a *CYP2B6*\*4 allélvariánshoz köthető magas bioaktivitás és a húgyhólyag károsodása között (Muñiz et al., 2022), ugyanakkor a vizsgálatunkba bevont kisbetegeknél a véres vizelet előfordulása sporadikus volt, viszont érdekes módon az érintett betegek mind normál *CYP2B6* metabolizáló képességűek voltak (8. táblázat). A gyenge/intermedier *CYP2B6* metabolizmussal rendelkezők körében ritkábban volt megfigyelhető toxikus esemény vélhetően a kisebb mennyiségben képződő toxikus metabolit miatt, mely vélhetően a csökkent enzimfunkcióval összefüggő *CYP2B6*\*6 allélvariáns gyakori jelenlétének köszönhető (8-10. táblázat). Eredményeinket igazolja az a megállapítás, hogy a ciklofoszfamid biotranszformációjának mértéke jelentős tényezőnek tekinthető a

ciklofoszfamid által indukált toxicitások kialakulásában (de Jonge et al., 2005). Ez alapján a biotranszformációban elsődleges *CYP2B6* genotípusának ismeretében becsülhető lehet a ciklofoszfamidhoz kötődő szervspecifikus toxicitás kialakulása, amely megfelelő, időben végzett szupportív kezeléssel javítható, így hozzájárulva a ciklofoszfamid személyre szabott klinikai alkalmazásához. A vizsgálat korlátainak tekinthetők, hogy a ciklofoszfamid toxikus mellékhatásainak megjelenését retrospektív adatgyűjtés, illetve analízis során vizsgáltuk, továbbá a *CYP2B6* működésén kívül nem vettük figyelembe a további biotranszformációban szerepet játszó *ALDH* genetikai variabilitását.

Másodlagos célkitűzésünk volt, hogy a neuroblasztómában szenvedő betegek ciklofoszfamid terápiára adott válaszát is megvizsgáljuk. Szignifikáns összefüggést találtunk a ciklofoszfamid válasz és a betegek életkora, valamint a nem között, azonban nem mutattunk ki összefüggést a betegek *CYP2B6* genotípusa alapján becsült metabolizáló képesség mértékétől (11. ábra, 11. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy a neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek terápiája nemzetközileg szabályozott, kockázati besorolás-alapú protokollja szerint a ciklofoszfamid mellett vinkrisztin, adriamicin, ciszplatin, karboplatin vagy etopizid daganatkellenes ágenseket tartalmazhat (Matthay et al., 2016; Meany, 2019; Qiu & Matthay, 2022), amelyek metabolizmusában további, a *CYP2B6*-tól eltérő gyógyszer-metabolizáló enzimek lehetnek meghatározóak. A kezelés előtti kockázati besorolás egyik legfontosabb szempontja a beteg kora a betegség diagnózisának idejében, mely alapján az 1-1,5 évnél fiatalabb gyermekek kedvezőbb terápia kimenetelre számíthatnak idősebb társaikhoz viszonyítva betegségük stádiumbesorolásától függetlenül (Saito et al., 1997; Cotterill et al., 2000; Aydn et al., 2009, Graef et al., 2020). A neuroblasztóma kórlefolyásában a betegek neme nem releváns tényező, azonban számos tanulmányban bemutatott túlélési vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a lányok kedvezőbb terápia kimenetelre számíthatnak a fiúkhoz képest (Pritchard et al., 1989; De Bernardi et al., 2019). Továbbá, a betegség kiújulása nagyobb eséllyel fordult elő az 5-éves követési periódus alatt 1. stádiumú betegséggel diagnosztizált fiú gyermekeknél, akiknél a tumorban nem tapasztaltak *MYCN* génamplifikációt, mint a hasonló állapotú lányoknál (De Bernardi et al., 2008).

A ciklofoszfamid biotranszformációban fontos CYP enzimek hozzájárulása a ciklofoszfamid terápia kimeneteléhez eddig kevésbé volt tisztázott. Néhány



tanulmányban a *CYP2B6* vagy *CYP2C19* genetikai variabilitása és a kedvező vagy kedvezőtlen terápia kimenetel között mutattak ki összefüggést, míg mások egyáltalán nem tudtak kimutatni kapcsolatot (Bray et al., 2010; Haroun et al., 2015; Labib et al., 2016; Shu et al., 2017; Vukovic et al., 2020; Pinto et al., 2021). Ezek közül kiemelendő a rabdomyosarkóma gyermekek bevonásával végzett két tanulmány vinkrisztin/aktinomicin/ciklofoszfamid (VAC) terápia értékelése. Míg Labib és mtsi a kedvezőbb terápia kimenetelt a *CYP2B6* K262R variánshoz (g.18053A>G) kötötték, addig Pinto és mtsi nem mutattak ki összefüggést a betegség 3-éves eseménymentes túlélési rátája és a betegek *CYP2B6* vagy *CYP2C19* genetikai variabilitása között (Labib et al., 2016; Pinto et al., 2021).

Összefoglalva, a ciklofoszfamid terápia hatékonysága és a *CYP2B6* genetikai variabilitás közötti összefüggéseket elsőként vizsgáltuk neuroblasztóma betegeknél, azonban nem találtunk kapcsolatot a ciklofoszfamid terápiára adott válasz és a *CYP2B6* genotípus alapján megállapított metabolizáló képesség között. Ennek lehet az az oka, hogy egyéb nem-genetikai tényezők (pl. kiegészítő gyógyszeres terápia) hatását nem vizsgáltuk, illetve etikai okok miatt nem vizsgáltuk a *CYP2B6* kifejeződését a betegek májszövetében. Vizsgálatsorozatunk eredményei alapján ugyanakkor a betegek *CYP2B6* genotípusa alapján becsült ciklofoszfamid-metabolizáló képesség a nem-kívánt mellékhatások kockázatára hívja fel a figyelmet, így a betegek *CYP2B6* genotípusának ismeretében a kezelőorvos időben felkészülhet a ciklofoszfamid által indukált mellékhatások súlyosságának csökkentését célzó terápia alkalmazásával.

## 6 Következtetések

A CYP2B6 az egyik legjelentősebb CYP izoenzim a májban, fenotípusát számos polimorf allélvariánsa mellett egyén-függő és környezeti nem-genetikai tényezők is befolyásolhatják. A daganatellenes terápiában is alkalmazott ciklofoszfamid részét képezi a neuroblasztóma csecsemő és gyermekkori daganatos megbetegedés terápiájának. A ciklofoszfamid enzimes biotranszformációja elsődleges az aktív metabolit, valamint a toxicitásért felelős metabolitok (foszforamid mustár, akrolein, klóracetaldehid) képződésében. A katalízisben főként a CYP2B6 és kisebb mértékben a CYP2C19 enzim szerepe igazolt, melyek genetikai variabilitása befolyásolhatja a metabolitok képződésének mértékét, így hatásuk lehet a neuroblasztóma betegek terápiájának kimenetelére, valamint a ciklofoszfamidhez kötődő toxikus mellékhatások kialakulására.

- Számos *CYP2B6* allélban megjelenő g.18053A>G (rs2279343) SNV kimutatására kétlépésből álló, *CYP2B6*-specifikus PCR-alapú módszert állítottunk be, mely során nehézséget jelentett a *CYP2B6* és *CYP2B7P* gének rendkívül magas nukleotidszekvencia homológiája. A módszer validálása során a pre-amplifikációs reakció *CYP2B6*-szelektivitását a *CYP2B6*- és *CYP2B7P*-specifikus *forward* primereket és egy közös *reverse* primert tartalmazó reakcióban igazoltuk, míg homozigóta vad (18053A/A), heterozigóta (18053A/G) és homozigóta mutáns (18053G/G) minták Sanger-szekvenálásával bizonyítottuk az alléldiszkrimináció megbízhatóságát. A g.18053A>G SNV kimutatási módszert együtt alkalmazva a g.-82T>C (rs34223104), g.15631G>T (rs3745274), valamint g.25505C>T (rs3211371) SNV-kre tervezett, validált PCR-alapú esszékkel meghatározhatóvá váltak a kaukázusi populáció leggyakrabban előforduló *CYP2B6* allélvariánsai (*CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9, valamint *CYP2B6*\*22).
- Humán májszövet minták *CYP2B6* fenotípusát (*CYP2B6* mRNA expresszióját, illetve *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitását) befolyásolta egyrészt a *CYP2B6* genetikai polimorfizmus, másrészt a genotípus alapján meghatározott fenotípust fenokonverziós faktorok módosították.
- A *CYP2B6* genotípus a májszövet minták közel harmadában magyarázta a *CYP2B6* mRNA expressziót, illetve *S*-mefenitoin *N*-demetiláció mértékét, míg

további 35%-ban a szervdonorok kórtörténetében rögzített nem-genetikai tényezők hatása volt megfigyelhető a CYP2B6 fenotípus kialakításában. A CYP-specifikus indukáló és gátlószer terápia, valamint a nem CYP-specifikus amoxicillin+klavulánsav terápia és a krónikus alkoholfogyasztás által indukált májkárosodás szignifikánsan hozzájárultak a máj CYP2B6 fenotípusához. Számos esetben a nem-genetikai tényezők expozíciója elfedte a *CYP2B6* genetikai háttér fenotípusra gyakorolt hatását, és módosította a genotípus által meghatározott fenotípust. A genetikai és nem-genetikai tényezők hatását figyelembe véve a májszövet minták körülbelül 60%-ánál lehetett indokolni a kialakult CYP2B6 fenotípust, míg 40%-ában a valós fenotípus eltért a genetikai és nem-genetikai tényezők alapján becsülhető fenotípustól.

- A ciklofoszfamid biotranszformációjában jelentős *CYP2B6* és *CYP2C19* (*CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3*, *CYP2C19\*4*, *CYP2C19\*17*) gének számos funkcionális eltérést okozó allélvariánsa volt kimutatható neuroblasztómában szenvedő betegeknél, amelyek alapjaiban határozzák meg a betegek CYP2B6 és CYP2C19 metabolizáló képességét.
- Összefüggést találtunk a neuroblasztómával diagnosztizált gyermekek CYP2B6 metabolizáló képessége és a ciklofoszfamid terápiát követően megjelenő mellékhatások (nagyértékű hematotoxicitás, májfunkció romlás) között, míg a sporadikusan előforduló, a kiválasztószervrendszert érintő toxicitás (húgyhólyag- és vesefunkció-károsodás) nem volt összefüggésben a CYP2B6 metabolizáló képességgel. A normál/emelkedett CYP2B6 metabolizáló betegek érzékenyebbek bizonyultak a ciklofoszfamid toxikus hatásaira, míg a gyenge/intermedier CYP2B6 metabolizálók esetében ritkábban alakultak ki mellékhatások, amely feltehetően a *CYP2B6\*6* allélvariáns okozta csökkent enzimaktivásra visszavezethető kismértékű toxikus metabolit képződésnek volt köszönhető. Eredményeink alapján a betegek *CYP2B6* genotípusának függvényében becsülhetővé válik a ciklofoszfamid kezelést követő mellékhatások kialakulása, így időben elkezdhető a toxikus események megjelenését enyhítő kiegészítő gyógyszeres terápia.
- A neuroblasztóma betegek CYP2B6 és CYP2C19 metabolizáló képessége és a multimodális terápia kimenetele között azonban nem sikerült összefüggést

kimutatnunk. A betegek neme és életkora azonban szignifikánsan befolyásolta a terápia kimenetelét.

## 7 Összefoglalás

A CYP2B6 számos, klinikailag is jelentős hatóanyag metabolizmusát katalizálja, így a daganatellenes ciklofoszfamid alkilálószerét, melyet többek között a neuroblasztóma daganatos megbetegedés terápiájában alkalmaznak. A CYP enzimek genetikai variabilitásának jelentős szerepe van a gyógyszer-metabolizmus egyének között megfigyelhető eltéréseiben; ugyanakkor a CYP fenotípus átmenetileg megváltozhat fenokonvertáló nem-genetikai tényezők (pl. gyógyszeres terápia, életkor, nem, komorbiditások) hatására. Humán májszövet minták felhasználásával összefüggést kerestünk a *CYP2B6* kaukázusi populációban leggyakoribb genetikai változatai, valamint a donorok kórtörténetében rögzített nem-genetikai tényezők és a máj CYP2B6 fenotípusa között. PCR-alapú kétlépes módszert fejlesztettünk az egyik leggyakoribb *CYP2B6* polimorfizmus (g.18053A>G) meghatározására. A májszövet minták *CYP2B6* genetikai variabilitása a májminták *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitásának, illetve mRNS expressziójának közel harmadát magyarázta, míg a minták további harmadánál fenokonverziós tényezők (*CYP2B6* indukálószer és gátlószer terápia, amoxillin+klavulánsav terápia, krónikus alkoholfogyasztás) indokolták a megváltozott fenotípust. Így megállapítható, hogy a *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslés csak korlátok között alkalmazható a klinikai gyakorlatban. Neuroblasztómával kezelt gyermekeknél a ciklofoszfamid terápiát követően kialakuló súlyos hematotoxicitás (limfopénia, trombocitopénia és monocitopénia) és enyhe májfunkció romlás szignifikáns összefüggést mutatott a betegek *CYP2B6* genotípusa alapján megállapított fenotípusával. Ugyanakkor a vesefunkció romlás és a húgyhólyag toxicitás (haemorrhagiás cystitis) megjelenése nem mutatott kapcsolatot a *CYP2B6* genotípussal. A ciklofoszfamid terápia hatékonyságát szignifikánsan befolyásolta a betegek életkora és neme, azonban a *CYP2B6* vagy *CYP2C19* metabolizáló képesség hatását nem sikerült igazolni. Eredményeink alapján a ciklofoszfamiddal kezelt betegek *CYP2B6* genotípusának ismeretében tervezhető a mellékhatások súlyosságának enyhítését célzó kiegészítő terápia a klinikai gyakorlatban. A *CYP2B6* genotípus alapú fenotípus becslés a fenokonverziós tényezők figyelembe vételével hozzájárulhat a személyre szabott ciklofoszfamid terápia kialakításához és a mellékhatás kockázat csökkentéséhez.

## 8 Summary

Human CYP2B6 catalyzes metabolism of many clinically important drugs, such as the antitumor alkylating agent cyclophosphamide, which is used in antitumor therapy of malignancies including neuroblastoma. Drug metabolism substantially varies between individuals, in which genetic polymorphisms of CYP enzymes play an important role; however, CYP phenotype may transiently change due to phenoconverting non-genetic factors (e.g. drug therapy, age, gender, co-morbidities). In human liver tissues, we investigated potential association between the hepatic CYP2B6 phenotype and *CYP2B6* genetic variants most frequent in Caucasian population, as well as non-genetic factors recorded in donor history. We have developed a two-step genotyping assay for identification of one of the most common *CYP2B6* polymorphisms (g.18053A>G). *CYP2B6* genetic variability was responsible for variations in *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity and mRNA expression in approximately one third of the liver tissues, while in further one third of the tissue samples, phenoconverting non-genetic factors (CYP2B6 inhibitors and inducers, amoxicillin+clavulanic acid treatment and chronic alcohol consumption) caused altered phenotype. In conclusion, *CYP2B6* genotype is appropriate for phenotype estimation with some limitations in clinical practice. In neuroblastoma patients, cyclophosphamide treatment induced severe hematotoxicity (lymphopenia, thrombocytopenia, and monocytopenia) and mild liver injury were significantly associated with *CYP2B6* genotype based phenotype. However, the occurrence of kidney and urinary bladder (hemorrhagic cystitis) toxicities was not related to *CYP2B6* genotype. The patients' age and gender, but not the CYP2B6 or CYP2C19 metabolizer phenotypes were associated with the cyclophosphamide treatment outcomes. Furthermore, our results suggest that on the basis of patients' *CYP2B6* genotype, interventions to alleviate cyclophosphamide-induced adverse effects can be prepared during cyclophosphamide treatment. *CYP2B6* genotype based phenotype estimation considering phenoconverting factors may contribute to tailored cyclophosphamide therapy and to reduction of the risk of toxic side effects.

## 9 Irodalomjegyzék

1. Achour, B., Barber, J., & Rostami-Hodjegan, A. (2014). Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: A meta-analysis. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(8), 1349–1356. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.058834>
2. Ahlmann, M., & Hempel, G. (2016). The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(4), 661–671. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3152-1>
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 Metabolism and Disposition*, 35(9), 1687–1693. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015511>
4. Aitken, A. E., Richardson, T. A., & Morgan, E. T. (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 123–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141059>
5. Al Koudsi, N., & Tyndale, R. F. (2010). Hepatic CYP2B6 is altered by genetic, physiologic, and environmental factors but plays little role in nicotine metabolism. *Xenobiotica*, 40(6), 381–392. <https://doi.org/10.3109/00498251003713958>
6. Ali, K., Sial, A. A. S., Baig, M. T., Ansari, S. H., Adil, S. O., & Shamsi, T. S. (2018). Detection of the incidence of infections and acute biochemical changes in diffused large B-cell lymphoma patients treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) with and without rituximab. *Current Drug Safety*, 13(2), 102–106. <https://doi.org/10.2174/1574886313666180321114839>
7. Ariyoshi, N., Ohara, M., Kaneko, M., Afuso, S., Kumamoto, T., Nakamura, H., ... Kitada, M. (2011). Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(11), 2045–2048. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.039586>

8. Aydın, G. B., Kutluk, M. T., Yalçın, B., Büyükpamukçu, M., Kale, G., Varan, A., ... Büyükpamukçu, N. (2009). Neuroblastoma in Turkish children: experience of a single center. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 31(7), 471–480. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3181a6dea4>
9. Aygun, N. (2018). Biological and genetic features of neuroblastoma and their clinical importance. *Current Pediatric Reviews*, 14(2), 73–90. <https://doi.org/10.2174/1573396314666180129101627>
10. Bagley, C. M., Bostick, F. W., & DeVita, V. T. (1973). Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research*, 33(2), 226–233.
11. Barber, J., Russell, M. R., Rostami-Hodjegan, A., & Achour, B. (2020). Characterization of CYP2B6 K262R allelic variants by quantitative allele-specific proteomics using a QconCAT standard. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 178, 112901. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112901>
12. Barnett, S., Errington, J., Sludden, J., Jamieson, D., Poinsignon, V., Paci, A., & Veal, G. J. (2021). Pharmacokinetics and pharmacogenetics of cyclophosphamide in a neonate and infant childhood cancer patient population. *Pharmaceuticals*, 14(3), 272. <https://doi.org/10.3390/ph14030272>
13. Benesic, A., Schwerdt, G., Hennemeier, I., Sauvant, C., Mildenerger, S., & Gekle, M. (2014). The nephrotoxic ifosfamide-metabolite chloroacetaldehyde interferes with renal extracellular matrix homeostasis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(4), 1106–1116. <https://doi.org/10.1159/000358680>
14. Bertilsson, L., Henthorn, T. K., Sanz, E., Tybring, G., Säwe, J., & Villén, T. (1989). Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: Relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin, hydroxylation phenotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 45(4), 348–355. <https://doi.org/10.1038/clpt.1989.40>
15. Botton, M. R., Whirl-Carrillo, M., Del L Tredici, A., Sangkuhl, K., Cavallari, L. H., Agúndez, J. A. G., ... Gaedigk, A. (2021). PharmVar GeneFocus: CYP2C19. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 109(2), 352–366. <https://doi.org/doi:10.1002/cpt.1973>
16. Bousman, C. A., Stevenson, J. M., Ramsey, L. B., Sangkuhl, K., Hicks, J. K., Strawn, J. R., ... Bishop, J. R. (2023). Clinical Pharmacogenetics Implementation



- Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6, SLC6A4, and HTR2A genotypes and serotonin reuptake inhibitor antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 114(1), 51–68. <https://doi.org/10.1002/cpt.2903>
17. Bray, J., Sludden, J., Griffin, M. J., Cole, M., Verrill, M., Jamieson, D., & Boddy, A. V. (2010). Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British Journal of Cancer*, 102(6), 1003–1009. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605587>
  18. Brodeur, G. M. (2018). Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell and Tissue Research*. 372(2), 277-286. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2761-2>
  19. Bumpus, N. N., & Hollenberg, P. F. (2008). Investigation of the mechanisms underlying the differential effects of the K262R mutation of P450 2B6 on catalytic activity. *Molecular Pharmacology*, 74(4), 990–999. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048637>
  20. Bumpus, N. N., Sridar, C., Kent, U. M., & Hollenberg, P. F. (2005). The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(6), 795–802. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.003749>
  21. Campagne, O., Zhong, B., Nair, S., Lin, T., Huang, J., Onar-Thomas, A., ... Stewart, C. F. (2020). Exposure-toxicity association of cyclophosphamide and its metabolites in infants and young children with primary brain tumors: Implications for dosing. *Clinical Cancer Research*, 26(7), 1563–1573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2685>
  22. Ceni, E., Mello, T., & Galli, A. (2014). Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17756–17772. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17756>
  23. Cezard, T., Cunningham, F., Hunt, S. E., Koylass, B., Kumar, N., Saunders, G., ... Keane, T. M. (2022). The European Variation Archive: A FAIR resource of genomic variation for all species. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D1216–D1220. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab960>
  24. Chan, L. N., & Anderson, G. D. (2014). Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with ethanol (alcohol). *Clinical Pharmacokinetics*, 53(12), 1115–1136. <https://doi.org/10.1007/s40262-014-0190-x>

25. Chang, T. K. H., Yu, L., Maurel, P., & Waxman, D. J. (1997). Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Research*, 57(10), 1946–1954.
26. Chen, Y., & Goldstein, J. (2009). The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Current Drug Metabolism*, 10(6), 567–578. <https://doi.org/10.2174/138920009789375397>
27. Chiang, Y. C., Wang, R. Y., Huang, C. L., Chen, S. H., Ho, W. J., Lane, H. Y., ... Ma, W. L. (2017). Reduced dosing and liability in methadone maintenance treatment by targeting oestrogen signal for morphine addiction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(12), 3552–3564. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13266>
28. Chinnaswamy, G., Errington, J., Foot, A., Boddy, A. V., Veal, G. J., & Cole, M. (2011). Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in paediatric patients receiving high-dose myeloablative therapy. *European Journal of Cancer*, 47(10), 1556–1563. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.03.008>
29. Choong, E., Loryan, I., Lindqvist, M., Nordling, Å., El Bouazzaoui, S., van Schaik, R. H., ... Ingelman-Sundberg, M. (2013). Sex difference in formation of propofol metabolites: a replication study. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 113(2), 126–131. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12070>
30. Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., ... Matthay, K. K. (2008). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 289–297. <https://doi.org/10.1200/jco.2008.16.6785>
31. Cotterill, S. J., Pearson, A. D. J., Pritchard, J., Foot, A. B. M., Roald, B., Kohler, J. A., & Imeson, J. (2000). Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: Results of The European Neuroblastoma Study Group “Survey” 1982-1992. *European Journal of Cancer*, 36(7), 901–908. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00058-7)
32. Cryle, M. J., & Schlichting, I. (2008). Structural insights from a P450 carrier protein complex reveal how specificity is achieved in the P450<sub>BioI</sub> ACP complex.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(41), 15696–15701. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805983105>
33. De Bernardi, Bruno, Di Cataldo, A., Garaventa, A., Massirio, P., Viscardi, E., Podda, M. G., ... Haupt, R. (2019). Stage 4 s neuroblastoma: features, management and outcome of 268 cases from the Italian Neuroblastoma Registry. *Italian Journal of Pediatrics*, 45(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0599-1>
34. De Bernardi, B., Mosseri, V., Rubie, H., Castel, V., Foot, A., Ladenstein, R., ... Michon, J. (2008). Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *British Journal of Cancer*, 99(7), 1027–1033. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604640>
35. de Jong, L. M., Boussallami, S., Sánchez-López, E., Giera, M., Tushuizen, M. E., Hoekstra, M., ... Manson, M. L. (2023). The impact of CYP2C19 genotype on phenoconversion by concomitant medication. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1201906. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1201906>
36. de Jong, L. M., Jiskoot, W., Swen, J. J., & Manson, M. L. (2020). Distinct effects of inflammation on cytochrome P450 regulation and drug metabolism: lessons from experimental models and a potential role for pharmacogenetics. *Genes*, 11(12), 1509. <https://doi.org/10.3390/genes11121509>
37. de Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Beijnen, J. H., & Rodenhuis, S. (2006). High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 94(9), 1226–1230. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603097>
38. de Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. (2005). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(11), 1135–1164. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544110-00003>.
39. DeLemos, A. S., Ghabril, M., Rockey, D. C., Gu, J., Barnhart, H. X., Fontana, R. J., ... Bonkovsky, H. L. (2016). Amoxicillin–clavulanate-induced liver injury. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(8), 2406–2416. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4121-6>
40. Deleve, L. D. (1996). Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology*, 24(4 I), 830–837. <https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v24.pm0008855185>

41. 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(9), 846. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090846>
42. Desta, Z., El-Boraie, A., Gong, L., Somogyi, A. A., Lauschke, V. M., Dandara, C., ... Gaedigk, A. (2021). PharmVar GeneFocus: CYP2B6. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 110(1), 82–97. <https://doi.org/10.1002/cpt.2166>
43. Desta, Z., Gammal, R. S., Gong, L., Whirl-Carrillo, M., Gaur, A. H., Sukasem, C., ... Haas, D. W. (2019). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2B6 and efavirenz-containing antiretroviral therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 106(4), 726–733. <https://doi.org/10.1002/cpt.1477>
44. Desta, Z., Saussele, T., Ward, B., Bliedernicht, J., Li, L., Klein, K., ... Zanger, U. M. (2007). Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics*, 8(6), 547–558. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.547>
45. Desta, Z., Zhao, X., Shin, J., & Flockhart, D. A. (2002). Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(12), 913–958. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241120-00002>
46. Dickmann, L. J., & Isoherranen, N. (2013). Quantitative prediction of CYP2B6 induction by estradiol during pregnancy: potential explanation for increased methadone clearance during pregnancy. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(2), 270–274. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.047118>
47. 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 Metabolism and Disposition*, 39(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.038679>
48. Dobrinas, M., Crettol, S., Oneda, B., Lahyani, R., Rotger, M., Choong, E., ... Eap, C. B. (2013). Contribution of CYP2B6 alleles in explaining extreme (S)-methadone plasma levels: a CYP2B6 gene resequencing study. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(2), 84–93. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835cb2e2>

49. Dockham, P. A., Lee, M. O., & Sladek, N. E. (1992). Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 43(11), 2453–2469. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90326-E](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90326-E)
50. Domeyer, B. E., & Sladek, N. E. (1980). Kinetics of cyclophosphamide biotransformation in vivo. *Cancer Research*, 40(1), 174–180.
51. Doogue, M. P., & Polasek, T. M. (2013). The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 4(1), 5–7. <https://doi.org/10.1177/2042098612469335>
52. DuBois, S. G., Kalika, Y., Lukens, J. N., Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Atkinson, J. B., ... Matthay, K. K. (1999). Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor Biology, and survival. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 21(3), 181–189. <https://doi.org/10.1097/00043426-199905000-00005>.
53. Ekhart, C., Rodenhuis, S., Smits, P. H. M., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2008). Relations between polymorphisms in drug-metabolising enzymes and toxicity of chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(11), 1009–1015. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328313aaa4>
54. Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638–647. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>
55. Eum, S., Sayre, F., Lee, A. M., Stingl, J. C., & Bishop, J. R. (2022). Association of CYP2B6 genetic polymorphisms with bupropion and hydroxybupropion exposure: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacotherapy*, 42(1), 34–44. <https://doi.org/10.1002/phar.2644>
56. Faucette, S. R., Hawke, R. L., Lecluyse, E. L., Shord, S. S., Yan, B., Laethem, R. M., & Lindley, C. M. (2000). Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(10), 1222–1230.

57. Ferguson, C. S., & Tyndale, R. F. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(12), 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.08.005>
58. Fraiser, L. H., Kanekal, S., & Kehrer, J. P. (1991). Cyclophosphamide toxicity: characterising and avoiding the problem. *Drugs*, 42(5), 781–795. <https://doi.org/10.2165/00003495-199142050-00005>
59. Furuta, T., Shirai, N., Sugimoto, M., Ohashi, K., & Ishizaki, T. (2004). Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics*, 5(2), 181–202. <https://doi.org/10.1517/phgs.5.2.181.27483>.
60. Gadel, S., Friedel, C., & Kharasch, E. D. (2015). Differences in methadone metabolism by CYP2B6 variants. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(7), 994–1001. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064352>
61. Gao, B., & Tsukamoto, H. (2016). Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology*, 150(8), 1704–1709. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.025>.
62. Garami, M., Schuler, D., & Jakab, Z. (2014). Az Országos Gyermektumor Regiszter jelentősége a gyermekonkológiai ellátásban. *Orvosi Hetilap*, 155(19), 732–739. <https://doi.org/10.1556/OH.2014.29918>
63. Georgakis, M. K., Dessypris, N., Baka, M., Moschovi, M., Papadakis, V., Polychronopoulou, S., ... Petridou, E. T. (2018). Neuroblastoma among children in Southern and Eastern European cancer registries: variations in incidence and temporal trends compared to US. *International Journal of Cancer*, 142(10), 1977–1985. <https://doi.org/10.1002/ijc.31222>
64. George, R. E., London, W. B., Cohn, S. L., Maris, J. M., Kretschmar, C., Diller, L., ... Look, A. T. (2005). Hyperdiploidy plus nonamplified mycn confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*, 23(27), 6466–6473. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.582>
65. Giorgianni, F., Bridson, P. K., Sorrentino, B. P., Pohl, J., & Blakley, R. L. (2000). Inactivation of aldophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozyme 3. *Biochemical Pharmacology*, 60(3), 325–338. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00344-0)

66. Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G. J., Vassal, G., & Paci, A. (2010). Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 6(8), 919–938. <https://doi.org/10.1517/17425255.2010.487861>
67. Gonzalez, F. J., & Lee, Y. (1996). Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *The FASEB Journal*, 10(10), 1112–1117. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.10.8751713>
68. Goodwin, B., Hodgson, E., Liddle, C. (1999). The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Molecular Pharmacology*, 56(6), 1329-1339. <https://doi.org/10.1124/mol.56.6.1329>
69. Goodwin, B., Moore, L. B., Stoltz, C. M., McKee, D. D., & Kliewer, S. A. (2001). Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Molecular Pharmacology*, 60(3), 427–431.
70. Goodwin, B., Redinbo, M. R., & Kliewer, S. A. (2002). Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42, 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.111901.111051>
71. Graef, S., Irwin, M. S., & Wan, M. J. (2020). Incidence and prognostic role of the ocular manifestations of neuroblastoma in children. *American Journal of Ophthalmology*, 213, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2020.01.023>
72. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
73. Gupta, S., Portales-Castillo, I., Daher, A., & Kitchlu, A. (2021). Conventional chemotherapy nephrotoxicity. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 28(5), 402-414.e1. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2021.08.001>
74. Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of Toxicology*, 94(11), 3671-3722. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>
75. Hamdane, D., Zhang, H., & Hollenberg, P. (2008). Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynthesis Research*, 98(1–3), 657–666. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9322-1>.

76. Harahap, Y., Yanuar, A., Muhammad, C., Melhan, M., & Purwanto, D. J. (2020). Quantification of 3-hydroxypropyl mercapturic acid in the urine of patients with breast cancer to monitor cyclophosphamide toxicity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 42(4), 548–553. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000737>
77. Haroun, F., Al-Shaar, L., Habib, R. H., El-Saghir, N., Tfayli, A., Bazarbachi, A., ... Zgheib, N. K. (2015). Effects of CYP2B6 genetic polymorphisms in patients receiving cyclophosphamide combination chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(1), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2632-4>
78. Hedrich, W. D., Hassan, H. E., & Wang, H. (2016a). Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(5), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.016>
79. Hedrich, W. D., Xiao, J., Heyward, S., Zhang, Y., Zhang, J., Baer, M. R., ... Wang, H. (2016b). Activation of the constitutive androstane receptor increases the therapeutic index of CHOP in lymphoma treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(3), 392–401. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0667>
80. Helsby, N. A., Yong, M., van Kan, M., de Zoysa, J. R., & Burns, K. E. (2019). The importance of both CYP2C19 and CYP2B6 germline variations in cyclophosphamide pharmacokinetics and clinical outcomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(9), 1925–1934. <https://doi.org/10.1111/bcp.14031>
81. Helsby, Nuala A., Hui, C. Y., Goldthorpe, M. A., Coller, J. K., Soh, M. C., Gow, P. J., ... Tingle, M. D. (2010). The combined impact of CYP2C19 and CYP2B6 pharmacogenetics on cyclophosphamide bioactivation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 70(6), 844–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03789.x>
82. Hertwig, F., Peifer, M., & Fischer, M. (2016). Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma. *Cell Cycle*, 15(3), 311–312. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1125243>
83. Heyn, H., White, R. B., & Stevens, J. C. (1996). Catalytic role of cytochrome P450 2B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin. *Drug Metabolism and Disposition*, 24(9), 948–954.



84. Highley, M. S., Landuyt, B., Prenen, H., Harper, P. G., & De Bruijn, E. A. (2022). The nitrogen mustards. *Pharmacological Reviews*, 74(3), 552–599. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000121>
85. Hill, H. A. O., Röder, A., & Williams, R. J. P. (1970). The chemical nature and reactivity of cytochrome P-450. 123–151. [https://doi.org/10.1007/3-540-05257-7\\_3](https://doi.org/10.1007/3-540-05257-7_3)
86. Hines, R. N. (2008). The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacology and Therapeutics*, 118(2), 250–267. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.02.005>
87. 't Hoen, P. A. C., Bijsterbosch, M. K., Van Berkel, T. J. C., Vermeulen, N. P. E., & Commandeur, J. N. M. (2001). Midazolam is a phenobarbital-like cytochrome P450 inducer in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(3), 921–927.
88. Hoffman, S. M. G., Nelson, D. R., & Keeney, D. S. (2001). Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics*, 11(8), 687–698. <https://doi.org/10.1097/00008571-200111000-00007>
89. Hofmann, M. H., Bliedernicht, J. K., Klein, K., Saussele, T., Schaeffeler, E., Schwab, M., & Zanger, U. M. (2008). Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(1), 284–292. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.133306>
90. Honda, M., Muroi, Y., Tamaki, Y., Saigusa, D., Suzuki, N., Tomioka, Y., ... Hiratsuka, M. (2011). Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(10), 1860–1865. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040352>
91. Huang, M., & Weiss, W. A. (2013). Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(10), a014415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014415>
92. Huang, Z., Roy, P., & Waxman, D. J. (2000). Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N- dechloroethylation of cyclophosphamide

- and ifosfamide. *Biochemical Pharmacology*, 59(8), 961–972.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00410-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00410-4)
93. Huitema, A. D.R., Spaander, M., Mathôt, R. A. A., Tibben, M. M., Holtkamp, M. J., Beijnen, J. H., & Rodenhuis, S. (2002). Relationship between exposure and toxicity in high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Annals of Oncology*, 13(3), 374–384.  
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdf052>
94. Huitema, Alwin D.R., Kerbusch, T., Tibben, M. M., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. (2000). Reduction of cyclophosphamide bioactivation by thioTEPA: Critical sequence-dependency in high-dose chemotherapy regimens. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46(2), 119–127.  
<https://doi.org/10.1007/s002800000132>
95. Huttner, A., Bielicki, J., Clements, M. N., Frimodt-Møller, N., Muller, A. E., Paccaud, J. P., & Mouton, J. W. (2020). Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.028>
96. Ilic, K., Hawke, R. L., Thirumaran, R. K., Schuetz, E. G., Hull, J. H., Kashuba, A. D., ... Chen, M. L. (2013). The influence of sex, ethnicity, and CYP2B6 genotype on bupropion metabolism as an index of hepatic CYP2B6 activity in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(7), 575–581.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.112.048108>
97. Incze, E., Mangó, K., Fekete, F., Kiss, Á. F., Póti, Á., Harkó, T., ... Monostory, K. (2023). Potential association of cytochrome P450 copy number alteration in tumour with chemotherapy resistance in lung adenocarcinoma patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13380.  
<https://doi.org/10.3390/ijms241713380>
98. Ing Lorenzini, K., Desmeules, J., Rollason, V., Bertin, S., Besson, M., Daali, Y., & Samer, C. F. (2021). CYP450 genotype—phenotype concordance using the geneva micrococktail in a clinical setting. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 730637.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.730637>
99. Irwin, M. S., Naranjo, A., Zhang, F. F., Cohn, S. L., London, W. B., Gastier-Foster, J. M., ... Hogarty, M. D. (2021). Revised Neuroblastoma Risk

- Classification System: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 39(29), 3229–3241. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00278>
100. Ionova, Y., Ashenhurst, J., Zhan, J., Nhan, H., Kosinski, C., Tamraz, B., & Chubb, A. (2020). CYP2C19 allele frequencies in over 2.2 million direct-to-consumer genetics research participants and the potential implication for prescriptions in a large health system. *Clinical and Translational Science*, 13(6), 1298–1306. <https://doi.org/10.1111/cts.12830>
  101. Jacob, R. M., Johnstone, E. C., Neville, M. J., & Walton, R. T. (2004). Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clinical Chemistry*, 50(8), 1372–1377. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031708>
  102. Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Michels, E., Mosseri, V., Ribeiro, A., Lequin, D., ... Delattre, O. (2009). Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(7), 1026–1033. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.0630>
  103. Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ohno, A., Makino, Y., Matsushima, E., Hanioka, N., & Ando, M. (2003). Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metabolism and Disposition*, 31(4), 398–403. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.4.398>
  104. Johansson, I., & Ingelman-Sundberg, M. (2008). CNVs of human genes and their implication in pharmacogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 123(1–4), 195–204. <https://doi.org/10.1159/000184709>
  105. Jones, R. J., Barber, J. P., Vala, M. S., Collector, M. I., Kaufmann, S. H., Ludeman, S. M., ... Hilton, J. (1995). Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood*, 85(10), 2742–2746. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.10.2742.bloodjournal85102742>
  106. Kastan, M. B., Schlaffer, E., Russo, J. E., Colvin, O. M., Civin, C. I., & Hilton, J. (1990). Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 75(10), 1947–1950. <https://doi.org/10.1182/blood.v75.10.1947.1947>
  107. Katoh, M., Nakajima, M., Shimada, N., Yamazaki, H., & Yokoi, T. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,4-dihydropyridine calcium

- antagonists: prediction of in vivo drug-drug interactions. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55(11–12), 843–852. <https://doi.org/10.1007/s002280050706>
108. Kearns, G. L., Abdel-Rahman, S. M., Alander, S. W., Blowey, D. L., Leeder, J. S., & Kauffman, R. E. (2003). Developmental pharmacology — drug disposition, action, and therapy in infants and children. *The New England Journal of Medicine*, 349(12), 1157–1167. <https://doi.org/10.1056/NEJMra035092>
  109. Kharasch, E. D., & Crafford, A. (2019). Common polymorphisms of CYP2B6 influence stereoselective bupropion disposition. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(1), 142–152. <https://doi.org/10.1002/cpt.1116>
  110. Kharasch, Evan D., Regina, K. J., Blood, J., & Friedel, C. (2015). Methadone pharmacogenetics: CYP2B6 polymorphisms determine plasma concentrations, clearance, and metabolism. *Anesthesiology*, 123(5), 1142–1153. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000867>
  111. Kirchheiner, J., Klein, C., Meineke, I., Sasse, J., Zanger, U. M., Mürdter, T. E., ... Brockmöller, J. (2003). Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics*, 13(10), 619–626. <https://doi.org/10.1097/00008571-200310000-00005>
  112. 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. *Pharmacological Reports*, 70(3), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.12.001>
  113. Klein, K., Lang, T., Saussele, T., Barbosa-Sicard, E., Schunck, W. H., Eichelbaum, M., ... Zanger, U. M. (2005). Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(12), 861–873. <https://doi.org/10.1097/01213011-200512000-00004>
  114. Klein, M., Thomas, M., Hofmann, U., Seehofer, D., Damm, G., & Zanger, U. M. (2015). A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and

- activity in primary human hepatocytes and HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(2), 273–283. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060962>
115. Klomp, S. D., Manson, M. L., Guchelaar, H. J., & Swen, J. J. (2020). Phenoconversion of cytochrome P450 metabolism: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 9, 2890. <https://doi.org/10.3390/jcm9092890>
  116. Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
  117. Koukouritaki, S. B., Manro, J. R., Marsh, S. A., Stevens, J. C., Rettie, A. E., McCarver, D. G., & Hines, R. N. (2004). Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3), 965–974. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060137>
  118. Krasulova, K., Holas, O., & Anzenbacher, P. (2017). Influence of amlodipine enantiomers on human microsomal cytochromes P450: stereoselective time-dependent inhibition of CYP3A enzyme activity. *Molecules*, 22(11), 1879. <https://doi.org/10.3390/molecules22111879>
  119. Labib, R. M., Abdelrahim, M. E. A., Elnadi, E., Hesham, R. M., & Yassin, D. (2016). CYP2B6rs2279343 is associated with improved survival of pediatric rhabdomyosarcoma treated with cyclophosphamide. *PLoS ONE*, 11(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158890>
  120. Lacroix, D., Sonnier, M., Moncion, A., Cheron, G., & Cresteil, T. (1997). Expression of CYP3A in the human liver - evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 625–634. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00625.x>
  121. Lamb, D. C., Lei, L., Warrillow, A. G. S., Lepesheva, G. I., Mullins, J. G. L., Waterman, M. R., & Kelly, S. L. (2009). The first virally encoded cytochrome P450. *Journal of Virology*, 83(16), 8266–8269. <https://doi.org/10.1128/jvi.00289-09>
  122. Lamba, V., Lamba, J., Yasuda, K., Strom, S., Davila, J., Hancock, M. L., ... Schuetz, E. G. (2003). Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (Constitutive

- Androstane Receptor) expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3), 906–922. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054866>
123. Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nüssler, A. K., Neuhaus, P., Hofmann, U., ... Zanger, U. M. (2001). Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics and Genomics*, 11(5), 399–415. <https://doi.org/10.1097/00008571-200107000-00004>
124. Langford, C. A. (1997). Complications of cyclophosphamide therapy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. <https://doi.org/10.1007/BF01526181>
125. Langmia, I. M., Just, K. S., Yamoune, S., Brockmöller, J., Masimirembwa, C., & Stingl, J. C. (2021). CYP2B6 functional variability in drug metabolism and exposure across populations—implication for drug safety, dosing, and individualized therapy. *Frontiers in Genetics*, 12, 692234. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.692234>
126. Leclerc, J., Tournel, G., Courcot-Ngoubo Ngangue, E., Pottier, N., Lafitte, J. J., Jaillard, S., ... Lo-Guidice, J. M. (2010). Profiling gene expression of whole cytochrome P450 superfamily in human bronchial and peripheral lung tissues: differential expression in non-small cell lung cancers. *Biochimie*, 92(3), 292–306. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.12.007>
127. Lee, C. R., Luzum, J. A., Sangkuhl, K., Gammal, R. S., Sabatine, M. S., Stein, C. M., ... Shuldiner, A. R. (2022). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2022 update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 112(5), 959–967. <https://doi.org/10.1002/cpt.2526>
128. Lenoir, C., Daali, Y., Rollason, V., Curtin, F., Gloor, Y., Bosilkovska, M., ... Samer, C. F. (2021). Impact of acute inflammation on cytochromes P450 activity assessed by the Geneva Cocktail. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 109(6), 1668–1676. <https://doi.org/10.1002/cpt.2146>
129. Li, H., Ferguson, S. S., & Wang, H. (2010). Synergistically enhanced CYP2B6 inducibility between a polymorphic mutation in CYP2B6 promoter and

- pregnane X receptor activation. *Molecular Pharmacology*, 78(4), 704–713.  
<https://doi.org/10.1124/mol.110.065185>
130. Li, P., Wang, G.-J., Robertson, T., & Roberts, M. (2009). Liver transporters in hepatic drug disposition: an update. *Current Drug Metabolism*, 10(5), 482–498. <https://doi.org/10.2174/138920009788898037>
131. Liu, J., Lu, Y.-F., Corton, J. C., & Klaassen, C. D. (2021). Expression of cytochrome P450 isozyme transcripts and activities in human livers. *Xenobiotica*, 51(3), 279–286. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1867929>.
132. Lobo, K. K., Gross, A. S., Williams, K. M., Liauw, W. S., Day, R. O., Blievernicht, J. K., ... McLachlan, A. J. (2006). Cytochrome P450 2B6 activity as measured by bupropion hydroxylation: effect of induction by rifampin and ethnicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 80(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2006.03.010>
133. London, W. B., Castleberry, R. P., Matthay, K. K., Look, A. T., Seeger, R. C., Shimada, H., ... Cohn, S. L. (2005). Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children’s Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 23(27), 6459–6465. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.571>
134. Lowry, H. O., Rosebrough, J. N., Farr, A. L., & Randall, J. R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 75–265. <https://doi.org/10.1074/jbc.193.1.75>
135. MacAllister, S. L., Martin-Brisac, N., Lau, V., Yang, K., & O’Brien, P. J. (2013). Acrolein and chloroacetaldehyde: an examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 202(1–3), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.11.017>
136. Mangoni, A. A., & Jackson, S. H. D. (2003). Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(1), 6–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.02007.x>
137. Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current Drug Targets*, 19(1), 38–54. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>

138. Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., & de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(6), 875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
139. Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16078. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78>
140. McCowage, G. B., Mrongovius, R., Alvaro, F., Cohn, R. J., Ziegler, D. S., Oswald, C., ... (ANZCHOG), A. and N. Z. C. H. and O. G. (2011). Treatment of children with poor risk solid tumors by further escalation of the VETOPEC regimen including very high-dose cyclophosphamide and peripheral stem cell support: an Australian and New Zealand Children's Hematology and Oncology Group Study. *Pediatric Blood & Cancer*, 57(6), 958–964. <https://doi.org/10.1002/pbc.23042>.
141. McCune, J. S., Salinger, D. H., Vicini, P., Oglesby, C., Blough, D. K., & Park, J. R. (2009). Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Pharmacology*, 49(1), 88–102. <https://doi.org/10.1177/0091270008325928>
142. McDonald, G. B., Slattery, J. T., Bouvier, M. E., Ren, S., Batchelder, A. L., Kalthorn, T. F., ... Gooley, T. (2003). Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 101(5), 2043–2048. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1860>
143. Meany, H. J. (2019). Non-high-risk neuroblastoma: classification and achievements in therapy. *Children*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/children6010005>
144. Miles, J. S., Spurr, N. K., Gough, A. C., Jowett, T., McLaren, A. W., Brook, J. D., & Wolf, C. R. (1988). A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 5783–5795. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.5783>
145. Ming, Z., Yongqiang, Z., Zijin, Z., Yan, X., Di, C., & Xiaoxin, T. (2019). Severe and prolonged cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a breast



- cancer patient carrying a CYP2B6\*7 variant. *Pharmacogenomics*, 20(16), 1119–1124. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0093>
146. Mlakar, V., Curtis, P. H. D., Uppugunduri, C. R. S., Krajcinovic, M., & Ansari, M. (2016). Pharmacogenomics in pediatric oncology: Review of gene—drug associations for clinical use. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091502>
147. Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., ... Pearson, A. D. J. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 298–303. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6876>
148. de Morais, S. M. F., Wilkinson, G. R., Blaisdell, J., Nakamura, K., Meyer, U. A., & Goldstein, J. A. (1994). The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15419–15422. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40694-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40694-6)
149. Muñiz, P., Andrés-Zayas, C., Carbonell, D., Chicano, M., Bailén, R., Oarbeascoa, G., ... Buño, I. (2022). Association between gene polymorphisms in the cyclophosphamide metabolism pathway with complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology*, 13, 1002959. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1002959>
150. Nakajima, M., Komagata, S., Fujiki, Y., Kanada, Y., Ebi, H., Itoh, K., ... Minami, H. (2007). Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/ pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(6), 431–445. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328045c4fb>
151. Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M. G., Maltais, L. J., Wain, H. M., & Nebert, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1097/00008571-200401000-00001>.
152. Ning, R., Zhan, Y., He, S., Hu, J., Zhu, Z., Hu, G., ... Liu, W. (2017). Interleukin-6 induces DEC1, promotes DEC1 interaction with RXRa and

- suppresses the expression of PXR, CAR and their target genes. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 866. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00866>
153. Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., ... 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 Metabolism and Disposition*, 40(1), 83–92. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042259>
154. Packiasabapathy, S., Aruldas, B. W., Zhang, P., Overholser, B. R., Quinney, S. K., & Sadhasivam, S. (2021). Novel associations between CYP2B6 polymorphisms, perioperative methadone metabolism and clinical outcomes in children. *Pharmacogenomics*, 22(10), 591–602. <https://doi.org/10.2217/pgs-2021-0039>
155. Park, J. R., Bagatell, R., Cohn, S. L., Pearson, A. D., Villablanca, J. G., Berthold, F., ... Valteau-Couanet, D. (2017). Revisions to the international neuroblastoma response criteria: a consensus statement from the National Cancer Institute clinical trials planning meeting. *Journal of Clinical Oncology*, 35(22), 2580–2587. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.72.0177>
156. Parkinson, A., Leonard, N., Draper, A., & Ogilvie, B. W. (2006). On the mechanism of hepatocarcinogenesis of benzodiazepines: evidence that diazepam and oxazepam are CYP2B inducers in rats, and both CYP2B and CYP4A inducers in mice. *Drug Metabolism Reviews*, 38(1–2), 235–259. <https://doi.org/10.1080/03602530600570081>
157. Parkinson, A., Mudra, D. R., Johnson, C., Dwyer, A., & Carroll, K. M. (2004). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 193–209. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.010>
158. Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P., & Vilarem, M. J. (2000). Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene

- regulation. *Molecular Pharmacology*, 58(6), 1441–1450.  
<https://doi.org/10.1124/mol.58.6.1441>
159. Pearson, A. D., Pinkerton, C. R., Lewis, I. J., Imeson, J., Ellershaw, C., & Machin, D. (2008). High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *The Lancet Oncology*, 9(3), 247–256. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70069-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70069-X)
160. Pearce, R. E., Gaedigk, R., Twist, G. P., Dai, H., Riffel, A. K., Leeder, J. S., & Gaedigk, A. (2016). Developmental expression of CYP2B6: a comprehensive analysis of mRNA expression, protein content and bupropion hydroxylase activity and the impact of genetic variation. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(7), 948–958. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.067546>
161. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., & Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82(10), 667–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
162. Pinto, N., Navarro, S. L., Rimorin, C., Wurscher, M., Hawkins, D. S., & McCune, J. S. (2021). Pharmacogenomic associations of cyclophosphamide pharmacokinetic candidate genes with event-free survival in intermediate-risk rhabdomyosarcoma: a report from the Children’s Oncology Group. *Pediatric Blood and Cancer*, 68(11), e29203. <https://doi.org/10.1002/pbc.29203>
163. Povirk, L. F., & Shuker, D. E. (1994). DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 318(3), 205–226. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)90015-9)
164. Pritchard, J., Barnes, J. M., Germond, S. M., & Wallendszus, K. R. (1989). Gender and survival in neuroblastoma. *The Lancet*. 1(8633), 328. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91336-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91336-6)
165. Qiu, B., & Matthay, K. K. (2022). Advancing therapy for neuroblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(8), 515–533. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00643-z>
166. Raccor, B. S., Claessens, A. J., Dinh, J. C., Park, J. R., Hawkins, D. S., Thomas, S. S., ... Totah, R. A. (2012). Potential contribution of cytochrome P450

- 2B6 to hepatic 4-hydroxycyclophosphamide formation in vitro and in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(1), 54–63. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.039347>
167. Renaud, H. J., Cui, J. Y., Khan, M., & Klaassen, C. D. (2011). Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicological Sciences*, 124(2), 261–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr240>
168. Rendic, S., & Guengerich, F. P. (2015). Survey of human oxidoreductases and cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of xenobiotic and natural chemicals. *Chemical Research in Toxicology*, 28(1), 38–42. <https://doi.org/10.1021/tx500444e>
169. Ribaud, H. J., Liu, H., Schwab, M., Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Motsinger-Reif, A. A., ... Haas, D. W. (2010). Effect of CYP2B6, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms on efavirenz pharmacokinetics and treatment response: an AIDS clinical trials group study. *Journal of Infectious Diseases*, 202(5), 717–722. <https://doi.org/10.1086/655470>
170. Rochat, B. (2005). Role of cytochrome P450 activity in the fate of anticancer agents and in drug resistance. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(4), 349–366. <https://doi.org/10.2165/00003088-200544040-00002>
171. Röhrich, C. R., Drögemöller, B. I., Ikediobi, O., Van Der Merwe, L., Grobbelaar, N., Wright, G. E. B., ... Warnich, L. (2016). CYP2B6\*6 and CYP2B6\*18 predict long-term efavirenz exposure measured in hair samples in HIV-positive South African Women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 32(6), 529–538. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0048>
172. Rollason, V., Lloret-Linares, C., Lorenzini, K. I., Daali, Y., Gex-Fabry, M., Piguet, V., ... Desmeules, J. (2020). Evaluation of phenotypic and genotypic variations of drug metabolising enzymes and transporters in chronic pain patients facing adverse drug reactions or non-response to analgesics: a retrospective study. *Journal of Personalized Medicine*, 10(4), 198. <https://doi.org/10.3390/jpm10040198>
173. Rotger, M., Tegude, H., Colombo, S., Cavassini, M., Furrer, H., Décosterd, L., ... Weber, R. (2007). Predictive value of known and novel alleles

- of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(4), 557–566. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100072>
174. Roth, A. D., & Lee, M. Y. (2017). Idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI): potential mechanisms and predictive assays. *BioMed Research International*, 2017, 9176937. <https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
175. Rubin, K., Janefeldt, A., Andersson, L., Berke, Z., Grime, K., & Andersson, T. B. (2015). HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(1), 119–125. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.059246>
176. Saito, T., Tsunematsu, Y., Saeki, M., Honna, T., Masaki, E., Kojima, Y., & Miyauchi, J. (1997). Trends of survival in neuroblastoma and independent risk factors for survival at a single institution. *Medical and Pediatric Oncology*, 29(3), 197–205. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-911X\(199709\)29:3<197::AID-MPO6>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-911X(199709)29:3<197::AID-MPO6>3.0.CO;2-8)
177. Scandlyn, M. J., Stuart, E. C., & Rosengren, R. J. (2008). Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 4(4), 413–424. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.413>
178. Schleiermacher, G., Michon, J., Ribeiro, A., Pierron, G., Mosseri, V., Rubie, H., ... Couturier, J. (2011). Segmental chromosomal alterations lead to a higher risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localised unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOPEN collaborative study). *British Journal of Cancer*, 105(12), 1940–1948. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.472>
179. Shah, R. R., & Smith, R. L. (2015). Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(3), 400–410. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061093>
180. Shimada, H., Umehara, S., Monobe, Y., Nakagawa, A., Goto, S., Gerbing, R. B., ... Matthay, K. K. (2001). International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic

- tumors. *Cancer*, 92(9), 2451–2461. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20011101\)92:9<2451::aid-cnrcr1595>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20011101)92:9<2451::aid-cnrcr1595>3.0.co;2-s)
181. Shu, W., Chen, L., Hu, X., Zhang, M., Chen, W., Ma, L., ... Zhang, Y. (2017). Cytochrome P450 genetic variations can predict mRNA expression, cyclophosphamide 4-hydroxylation, and treatment outcomes in Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Pharmacology*, 57(7), 886–898. <https://doi.org/10.1002/jcph.878>
182. Shugg, T., Ly, R. C., Rowe, E. J., Philips, S., Hyder, M. A., Radovich, M., ... Skaar, T. C. (2022). Clinical opportunities for germline pharmacogenetics and management of drug-drug interactions in patients with advanced solid cancers. *JCO Precision Oncology*, (6), e2100312. <https://doi.org/10.1200/PO.21.00312>
183. Sim, S. C., Risinger, C., Dahl, M. L., Aklillu, E., Christensen, M., Bertilsson, L., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 79(1), 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.10.002>
184. Skoda, J., Dusek, J., Drastik, M., Stefela, A., Dohnalova, K., Chalupsky, K., ... Pavek, P. (2020). Diazepam promotes translocation of human constitutive androstane receptor (CAR) via direct interaction with the ligand-binding domain. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122532>
185. Slave, I., Ellenbogen, R., Jung, W. H., Vawter, G. F., Kretschmar, C., Grier, H., & Korf, B. R. (1990). *myc* gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Research*, 50(5), 1459–63.
186. Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L., & Kiang, D. T. (2002). Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(4), 309–321. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0412-4>
187. Soldin, O. P., & Mattison, D. R. (2009). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clinical Pharmacokinetics*, 48(3), 143–157. <https://doi.org/10.2165/00003088-200948030-00001>

188. Stanke-Labesque, F., Gautier-Veyret, E., Chhun, S., & Guilhaumou, R. (2020). Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacology and Therapeutics*, 215, 107627. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107627>
189. Stanley, L. A. (2017). Drug Metabolism. In Badal, S., Delgoda, R. (Ed.), *Pharmacognosy* (pp. 527-545). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00027-5>.
190. Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L. A. G., Moreno, F., Dolya, A., Bray, F., ... Contributors, I.-3. (2017). International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology*, 18(6), 719–731. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30186-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30186-9)
191. Štěpánková, M., Krasulová, K., Dořičáková, A., Kurka, O., Anzenbacher, P., & Dvořák, Z. (2016). Optical isomers of dihydropyridine calcium channel blockers display enantiospecific effects on the expression and enzyme activities of human xenobiotics-metabolizing cytochromes P450. *Toxicology Letters*, 262, 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.10.005>
192. Stephens, M., & Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American Journal of Human Genetics*, 76(3), 449–462. <https://doi.org/10.1086/428594>
193. Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Society of Human Genetics*, 68(4), 978–989. doi: 10.1086/319501
194. Stern, S., Liang, D., Li, L., Kurian, R., Lynch, C., Sakamuru, S., ... Wang, H. (2022). Targeting CAR and Nrf2 improves cyclophosphamide bioactivation while reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity in triple-negative breast cancer treatment. *JCI Insight*, 7(12), e153868. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.153868>
195. Strom, C. M., Goos, D., Crossley, B., Zhang, K., Buller-Burkle, A., Jarvis, M., ... Sun, W. (2012). Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory. *Genetics in Medicine*, 14(1), 95–100. <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e3182329870>

196. Sun, G., Grindstaff, R. D., Thai, S. F., Lambert, G. R., Tully, D. B., Dix, D. J., & Nesnow, S. (2007). Induction of cytochrome P450 enzymes in rat liver by two conazoles, myclobutanil and triadimefon. *Xenobiotica*, 37(2), 180–193. <https://doi.org/10.1080/00498250601059942>
197. Talakad, J. C., Kumary, S., & Halpert, J. R. (2009). Decreased susceptibility of the cytochrome P450 2B6 variant K262R to inhibition by several clinically important drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(3), 644–650. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023655>
198. Tanner, N., Kubik, L., Luckert, C., Thomas, M., Hofmann, U., Zanger, U. M., ... Braeuning, A. (2018). Regulation of drug metabolism by the interplay of inflammatory signaling, steatosis, and xeno-sensing receptors in HepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 46(4), 326–335. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.078675>
199. Temesvári, M., Kóbori, L., Paulik, J., Sařváry, E., Belic, A., & Monostory, K. (2012). Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1), 294–305. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.189597>
200. Teschke, R. (2018). Top-ranking drugs out of 3312 drug-induced liver injury cases evaluated by the Roussel Uclaf Causality Assessment Method. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 14(11), 1169–1187. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1539077>
201. Teschke, R., & Danan, G. (2021). Idiosyncratic drug induced liver injury, cytochrome P450, metabolic risk factors and lipophilicity: highlights and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3441. <https://doi.org/10.3390/ijms22073441>
202. Thelen, K., & Dressman, J. B. (2009). Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(5), 541–558. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.05.0002>
203. Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), 11018–11032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>



204. Tsubota, S., & Kadomatsu, K. (2018). Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. *Cell and Tissue Research*, 372(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2796-z>
205. Tsuji, D., Ikeda, M., Yamamoto, K., Nakamori, H., Kim, Y. Il, Kawasaki, Y., ... Itoh, K. (2016). Drug-related genetic polymorphisms affecting severe chemotherapy-induced neutropenia in breast cancer patients. A hospital-based observational study. *Medicine (United States)*, 95(44), e5151. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005151>
206. Turpeinen, M., & Zanger, U. M. (2012). Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 27(4), 185–197. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2012-0027>
207. van der Hoeven, A. T., & Coon, J. M. (1974). Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 249(19), 6302–6310.
208. van Groen, B. D., Allegaert, K., Tibboel, D., & de Wildt, S. N. (2022). Innovative approaches and recent advances in the study of ontogeny of drug metabolism and transport. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(10), 4285–4296. <https://doi.org/10.1111/bcp.14534>
209. Valentijn, L. J., Koster, J., Zwijnenburg, D. A., Hasselt, N. E., Van Sluis, P., Volckmann, R., ... Versteeg, R. (2015). TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nature Genetics*, 47(12), 1411–1414. <https://doi.org/10.1038/ng.3438>
210. Veal, G. J., Cole, M., Chinnaswamy, G., Sludden, J., Jamieson, D., Errington, J., ... Boddy, A. V. (2016). Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer*, 55, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.12.007>
211. Vet, N. J., De Hoog, M., Tibboel, D., & de Wildt, S. N. (2011). The effect of inflammation on drug metabolism: a focus on pediatrics. *Drug Discovery Today*, 16(9–10), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.014>
212. Vo, K. T., Matthay, K. K., Neuhaus, J., London, W. B., Hero, B., Ambros, P. F., ... DuBois, S. G. (2014). Clinical, biologic, and prognostic differences on

- the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Journal of Clinical Oncology*, 32(28), 3169–3176. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.1621>
213. Vrzal, R., Kubesova, K., Pavek, P., & Dvorak, Z. (2010). Benzodiazepines medazepam and midazolam are activators of pregnane X receptor and weak inducers of CYP3A4: Investigation in primary cultures of human hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines. *Toxicology Letters*, 193(2), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.01.004>
214. Vukovic, V., Karan-Djurasevic, T., Antic, D., Tosic, N., Kostic, T., Marjanovic, I., ... Mihaljevic, B. (2020). Association of SLC28A3 gene expression and CYP2B6\*6 allele with the response to fludarabine plus cyclophosphamide in chronic lymphocytic leukemia patients. *Pathology and Oncology Research*, 26(2), 743–752. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00613-4>
215. Wang, D., Li, L., Yang, H., Ferguson, S. S., Baer, M. R., Gartenhaus, R. B., & Wang, H. (2013). The constitutive androstane receptor is a novel therapeutic target facilitating cyclophosphamide-based treatment of hematopoietic malignancies. *Blood*, 121(2), 329–338. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436691>
216. Wang, P. F., Neiner, A., & Kharasch, E. D. (2019). Efavirenz metabolism: influence of polymorphic CYP2B6 variants and stereochemistry. *Drug Metabolism and Disposition*, 47(10), 1195–1205. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.086348>
217. Wang, P. F., Neiner, A., & Kharasch, E. D. (2020). Stereoselective bupropion hydroxylation by cytochrome P450 CYP2B6 and cytochrome P450 oxidoreductase genetic variants. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(6), 438–445. <https://doi.org/10.1124/DMD.119.090407>
218. Ward, B. A., Gorski, J. C., Jones, D. R., Hall, S. D., Flockhart, D. A., & Desta, Z. (2003). The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *Journal*

- of *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(1), 287–300.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.103.049601>
219. Watanabe, T., Saito, T., Rico, E. M. G., Hishinuma, E., Kumondai, M., Maekawa, M., ... Hiratsuka, M. (2018). Functional characterization of 40 CYP2B6 allelic variants by assessing efavirenz 8-hydroxylation. *Biochemical Pharmacology*, 156, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.09.010>
220. Waxman, D. J., & Holloway, M. G. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular Pharmacology*, 76(2), 215–228. <https://doi.org/10.1124/mol.109.056705>
221. Weber, A., Szalai, R., Sipeky, C., Magyari, L., Melegh, M., Jaromi, L., ... Melegh, B. (2015). Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples. *Pharmacological Reports*, 67(3), 460–464. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.11.006>
222. Whittle, S. B., Smith, V., Doherty, E., Zhao, S., McCarty, S., & Zage, P. E. (2017). Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(4), 369–386. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1285230>
223. Xie, H. J., Yasar, Ü., Lundgren, S., Griskevicius, L., Terelius, Y., Hassan, M., & Rane, A. (2003). Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics Journal*, 3(1), 53–61. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500157>
224. Xu, C., Ogburn, E. T., Guo, Y., & Desta, Z. (2012). Effects of the CYP2B6\*6 allele on catalytic properties and inhibition of CYP2B6 in vitro: implication for the mechanism of reduced efavirenz metabolism and other CYP2B6 substrates in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(4), 717–725. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042416>
225. Yamano, S., Nhamburo, P. T., Aoyama, T., Meyer, U. A., Inaba, T., Kalow, W., ... Gonzalez, F. J. (1989). cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential

- expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry*, 28(18), 7340–7348.  
<https://doi.org/10.1021/bi00444a029>
226. Yoon, H. Y., Cho, Y. A., Yee, J., & Gwak, H. S. (2020). Effects of CYP2B6 polymorphisms on plasma nevirapine concentrations: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 17390.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74506-x>
227. Yuan, R., Madani, S., Wei, X. X., Reynolds, K., & Huang, S. M. (2002). Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(12), 1311–1319. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.12.1311>
228. Yule, S. M., Boddy, A. V., Cole, M., Price, L., Wyllie, R., Tasso, M. J., ... Idle, J. R. (1996). Cyclophosphamide pharmacokinetics in children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 41(1), 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1996.tb00153.x>
229. Zanger, U. M., & Klein, K. (2013). Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Genetics*, 4, 24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00024>
230. Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
231. Zelko, I., & Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3557>
232. Zhang, H., Sridar, C., Kenaan, C., Amunugama, H., Ballou, D. P., & Hollenberg, P. F. (2011). Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: A charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome P450-reductase complex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 338(3), 803–809. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.183111>

233. Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., ... Qin, S. (2021). Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>
234. Zhou, Y., & Lauschke, V. M. (2022). The genetic landscape of major drug metabolizing cytochrome P450 genes—an updated analysis of population-scale sequencing data. *The Pharmacogenomics Journal*, 22(5–6), 284–293. <https://doi.org/10.1038/s41397-022-00288-2>
235. Zukunft, J., Lang, T., Richter, T., Hirsch-Ernst, K. I., Nussler, A. K., Klein, K., ... Zanger, U. M. (2005). A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1772–1782. <https://doi.org/10.1124/mol.104.008086>
236. PharmVar. (2023/07) <https://www.pharmvar.org/> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
237. PharmVar *CYP2B6*. (2023/07) <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
238. PharmVar *CYP2B6* gene-specific information tables. (2023/07) <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
239. PharmVar *CYP2C19*. (2023/07) <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
240. PharmVar *CYP2C19* gene-specific information tables. (2023/07) <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
241. NCBI Gene *CYP2B6*. (2023/10) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1555> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
242. NCBI Gene *CYP2B7P*. (2023/10) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1556> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
243. EMBL-EVI EVA Association between CYP2B6 genetic variability and cyclophosphamide therapy in pediatric patients with neuroblastoma (2023/05). <https://www.ebi.ac.uk/eva/?eva-study=PRJEB61781> (utolsó letöltés: 2023.11.26)

244. IDT Oligoanalyzer™ Tool (2023)  
<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (utolsó letöltés: 2023.11.26)
245. NCBI Nucleotide-BLAST (2023)  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=G  
eoBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=G<br/>eoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) (utolsó letöltés: 2023.11.26)
246. NCBI Primer-Blast (2023) [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-  
blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-<br/>blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (utolsó letöltés: 2023.11.26)

## **10 Saját publikációk jegyzéke**

### **10.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke**

1. **Mangó K.**, Fekete F., Kiss Á. F., Erdős R., Fekete J. T., Búdi T., Bruckner E., Garami M., Micsik T., Monostory K. (2023) Association between *CYP2B6* genetic variability and cyclophosphamide therapy in pediatric patients with neuroblastoma. *Scientific Reports*, 13, 11770.

D1, IF: 4,6\*

2. **Mangó K.**, Kiss Á. F., Fekete F., Erdős R., Monostory K. (2022) *CYP2B6* allelic variants and non-genetic factors influence *CYP2B6* enzyme function *Scientific Reports*, 12, 2984.

D1, IF: 4,6

### **10.2 Disszertációtól független publikációk jegyzéke**

1. Incze E., **Mangó K.**, Fekete F., Kiss Á. F., Póti Á., Harkó T., Moldvay J., Szüts D., Monostory, K. (2023) Potential association of cytochrome P450 copy number alteration in tumour with chemotherapy resistance in lung adenocarcinoma patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 13380.

Q1, IF: 5,6\*

2. Resál T., **Mangó K.**, Bacsur P., Szántó K., Pigniczki D., Keresztes Cs., Rutka M., Bálint A., Milassin Á., Bor R., Fábrián A., Szepes Z., Farkas K., Monostory K., Molnár T. (2023) Possible genetical predictors of efficacy and safety of budesonide-MMX in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, and safety comparison with methylprednisolone. *Expert Opinion on Drug Safety*, 22(6), 517–524.

Q1, IF: 3,1\*

3. Fekete F., **Mangó K.**, Minus A., Tóth K., Monostory K. (2022) *CYP1A2* mRNA expression rather than genetic variants indicate hepatic *CYP1A2* activity. *Pharmaceutics*, 14, 532.

Q1, IF: 5,4

4. Nagy I., Baráth B. R., **Mangó K.**, Shemirani A. H., Monostory K., Nemes B. (2022) The prognostic role of CYP enzyme in kidney transplantation: a single centre experience. *Transplantation Proceedings*, 54(9), 2584–2588.

IF: 0,9

5. 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. *Scientific Reports*, 11, 21389.

D1, IF: 4,996

6. 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. *Scientific Reports*, 11, 17081.

D1, IF: 4,996

\*A 2023-ban megjelent közleményekhez a folyóirat 2022. évi impakt faktorát tüntettem fel.

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: **9,2**

A disszertációtól független publikációk összesített impakt faktora: **24,994**

A megjelent első és társszerzős publikációim összesített impakt faktora: **34,194**



## **11 Köszönetnyilvánítás**

Elsők között szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Monostory Katalinnak a munkám során és a disszertációm írásában nyújtott szakmai segítségét, a segítőkész tanácsait, pontos és precíz iránymutatásait, valamint hogy infrastruktúrális háttérrel biztosított kutatásaim számára.

Köszönöm az Enzimológiai Intézet jelenlegi Igazgatójának Dr. Hunyady Lászlónak, valamint a jelenlegi Főigazgatónak Dr. Buday Lászlónak, hogy helyet biztosított munkámnak a Természettudományi Kutatóközpontban.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományi Iskolájának és vezetőjének Dr. Zelkó Románának, valamint az Experimentális és klinikai farmakológia program vezetőjének Dr. Szökő Évának, hogy PhD tanulmányaimat iskolájuk keretein belül végezhettem el.

Köszönettel tartozom Dr. Füredi Andrásnak a munkahelyi vitám bírálatának elkészítéséért, valamint a vitában részt vevők segítségéért.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Sebészeti, Transzplantációs és Gasztroenterológiai Klinika munkatársainak, Dr. Kóbori Lászlónak és Dr. Sárváry Enikőnek a szervdonorok májszövet mintáinak és klinikai adatainak biztosításáért, valamint a Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati Központ munkatársainak, Dr. Garami Miklósnak, Dr. Brückner Editnek és Dr. Búdi Tamásnak a daganatos gyermekek vérmintáinak és klinikai adatainak biztosításáért.

Köszönöm Dr. Fekete János Tibornak a regressziós analízisekhez nyújtott szakmai iránymutatásait.

Köszönettel tartozom a Metabolikus Gyógyszer-Kölcsönhatások Kutatócsoport minden volt és jelenlegi tagjának, különösen Fekete Ferencnek és Dr. Kiss Ádám Ferencnek, akik támogatásukkal hozzájárultak munkám elkészültéhez.

Végezetül köszönetet szeretnék mondani férjemnek, szüleimnek, hugaimnak és barátaimnak, akik feltétel nélküli támogatását és határtalan türelmét sosem fogom tudni eléggé megköszönni.

## **12 Függelék**

Függelék 1. táblázat. A neuroblasztóma megbetegedés stádium-besorolása (Monclair et al., 2009).

<b>Stádium</b>	<b>Leírás</b>
<b>1</b>	Helyi tumor, mely sebészetiileg teljesen eltávolítható.
<b>2</b>	Helyi tumor, mely teljesen vagy részben eltávolítható. A tumorraal azonos oldali nyirokcsomó érintett.
<b>3</b>	Nem eltávolítható tumor, mely meghaladja a test középvonalát.
<b>4</b>	Szétterjedt daganat távoli nyirokcsomó-, csont-, csontvelő-, máj-, bőr-áttétellel.
<b>4S</b>	Helyi tumor (1., 2. stádium) szétterjedéssel (bőr, máj, csontvelő), egyéves életkor előtti megjelenéssel.

Függelék 2. táblázat: *CYP2B6*, illetve *CYP2C19* genotípus alapú fenotípus becslés a CPIC kritériumrendszere alapján (Desta 2019, Lee 2022).

<b>CYP enzim</b>	<b>CYP genotípusból becsült CYP fenotípus</b>	<b>Allél-funkcionalitás</b>	<b>Példák CYP típusokra</b>
<b>CYP2B6</b>	PM	Két allél enzimaktivitás ↓ VAGY Két allél enzimaktivitás Ø VAGY Egy allél enzimaktivitás ↓ és egy allél enzimaktivitás Ø	*6/*6  *18/*18  *6/*18
	IM	Egy allél enzimaktivitás ↔ és egy allél enzimaktivitás ↓ VAGY Egy allél enzimaktivitás ↔ és egy allél enzimaktivitás Ø VAGY Egy allél enzimaktivitás ↑ és egy allél enzimaktivitás ↓ VAGY Egy allél enzimaktivitás ↑ és egy allél enzimaktivitás Ø	*1/*6  *1/*18  *4/*6  *22/*18
	NM	Két allél enzimaktivitás ↔	*1/*1
	RM	Egy allél enzimaktivitás ↔ és egy allél enzimaktivitás ↑	*1/*4, *1/*22
	UM	Két allél enzimaktivitás ↑	*4/*4, *22/*22
	<b>CYP2C19</b>	PM	Két allél enzimaktivitás Ø
IM		Egy allél enzimaktivitás ↔ és egy allél enzimaktivitás Ø VAGY Egy allél enzimaktivitás ↑ és egy allél enzimaktivitás Ø	*1/*2  *2/*17
NM		Két allél enzimaktivitás ↔	*1/*1
RM		Egy allél enzimaktivitás ↔ és egy allél enzimaktivitás ↑	*1/*17
UM		Két allél enzimaktivitás ↑	*17/*17

PM: gyenge metabolizáló, IM: intermediér metabolizáló, EM: gyors metabolizáló

Függelék 3. táblázat: Májzsövet donorok demográfiai és klinikai adatai.

			N
<b>Donorok száma</b>			119
<b>Kor (év)<sup>a</sup></b>			47 (18;74)
<b>Nem</b>	Nő/férfi		52/67
<b>Halál oka</b>	Cerebralis haemorrhagia/hematóma	Subarachnoidalis haemorrhagia	25
		Subduralis haemorrhagia	6
		Intraventricularis haemorrhagia	7
		Cerebralis aneurizma	5
		Ismeretlen eredet	4
	Sztrók	Iszkémiás sztrók	8
		Haemorrhagiás sztrók	2
	Tumor		34
	Baleset	Közúti baleset	13
		Epilepsziás roham okozta koponya sérülés	1
		Öngyilkosság	1
		Ismeretlen eredetű koponya sérülés	5
		Ismeretlen eredet	8
<b>Nem-genetikai faktorok a donorok anamnézisében</b>	Amoxicillin+klavulánsav terápia		7
	Krónikus alkoholfogyasztás		11
	CYP2B6 indukálószer terápia		23
	CYP2B6 gátlószer terápia		2

<sup>a</sup> medián (min; max)

Függelék 4. táblázat: Neuroblasztómával diagnosztizált betegek demográfiai és klinikai adatai.

Demográfiai és klinikai adatok		N
Betegek száma		50
Betegek kora a betegség diagnózisakor (év) <sup>a</sup>		2,32 (0,10; 15,8)
	<1,5	16
	>1,5	34
Nem	Lány/fiú	21/29
Testsúly (kg) <sup>a</sup>		12,35 (0,59; 53,6)
Kockázati besorolás	Alacsony-kockázatú	15
	Magas-kockázatú	35
Ciklofoszfamid dózis (mg/kg/day)	<i>Rapid COJEC</i> <sup>b</sup>	10,5-25,5
	<i>Infant CO</i> vagy <i>CADO</i> <sup>b</sup>	0,8-2
	<i>CADO</i> <sup>b</sup> (≥1,5 év feletti)	2,2-2,6
Terápia kimenetel: Reagálók	Teljes remisszió	16
	Részleges remisszió	8
Terápia kimenetel: Nem-reagálók	Stabil betegség	9
	Progrediáló betegség/elhalálozottak	17

<sup>a</sup>medián (min; max); <sup>b</sup>*COJEC* ciszplatin-vinkrisztin-karboplatin-etopozid-ciklofoszfamid, *CO* ciklofoszfamid-vinkrisztin, *CADO* ciklofoszfamid-adriamicin-vinkrisztin

Függelék 5. táblázat: A CTC kritériumrendszer<sup>a</sup> alapján becsült ciklofoszfamid kezelés okozta máj, vese és hematológiai toxicitások mértéke neuroblasztóma betegeknél.

Paraméterek <sup>a</sup>	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
<b>Hematológiai</b>				
Limfociták <sup>b</sup>	3/47	2/47	41/47	-
Neutrofil granulociták <sup>c</sup>	2/49	1/49	4/49	42/49
Trombociták <sup>d</sup>	3/50	3/50	23/50	11/50
<b>Májfunkció</b>				
GPT <sup>e</sup>	18/49	4/49	1/49	-
GGT <sup>e</sup>	12/49	3/49	1/49	-
<b>Vesefunkció</b>				
Kreatinin <sup>f</sup>	2/49	-	-	-

<sup>a</sup>National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (CTC, verzió 2.0) alapján;

<sup>b</sup>Grade 1: <LLN-1.0x10<sup>9</sup>/L; Grade 2: >0.5-1.0x10<sup>9</sup>/L; Grade 3: <0.5x10<sup>9</sup>/L

<sup>c</sup>Grade 1: >1.5-2.0x10<sup>9</sup>/L; Grade 2: >1.0-1.5x10<sup>9</sup>/L; Grade 3: >0.5-1.0x10<sup>9</sup>/L; Grade 4: <0.5x10<sup>9</sup>/L

<sup>d</sup>Grade 1: <LLN-75x10<sup>9</sup>/L; Grade 2: ≥50-<75x10<sup>9</sup>/L; Grade 3: ≥10-<50x10<sup>9</sup>/L; Grade 4: <10x10<sup>9</sup>/L

<sup>e</sup>Grade 1: >ULN-2.5xULN; Grade 2: >2.5-5.0xULN; Grade 3: >5.0-20.0xULN; Grade 4: >20.0xULN

<sup>f</sup>Grade 1: >ULN-1.5xULN; Grade 2: >1.5-3.0xULN; Grade 3: >3.0-6.0xULN; Grade 4: >6.0xULN

ULN: normál referencia tartomány felső határértéke; LLN: normál referencia tartomány alsó határértéke

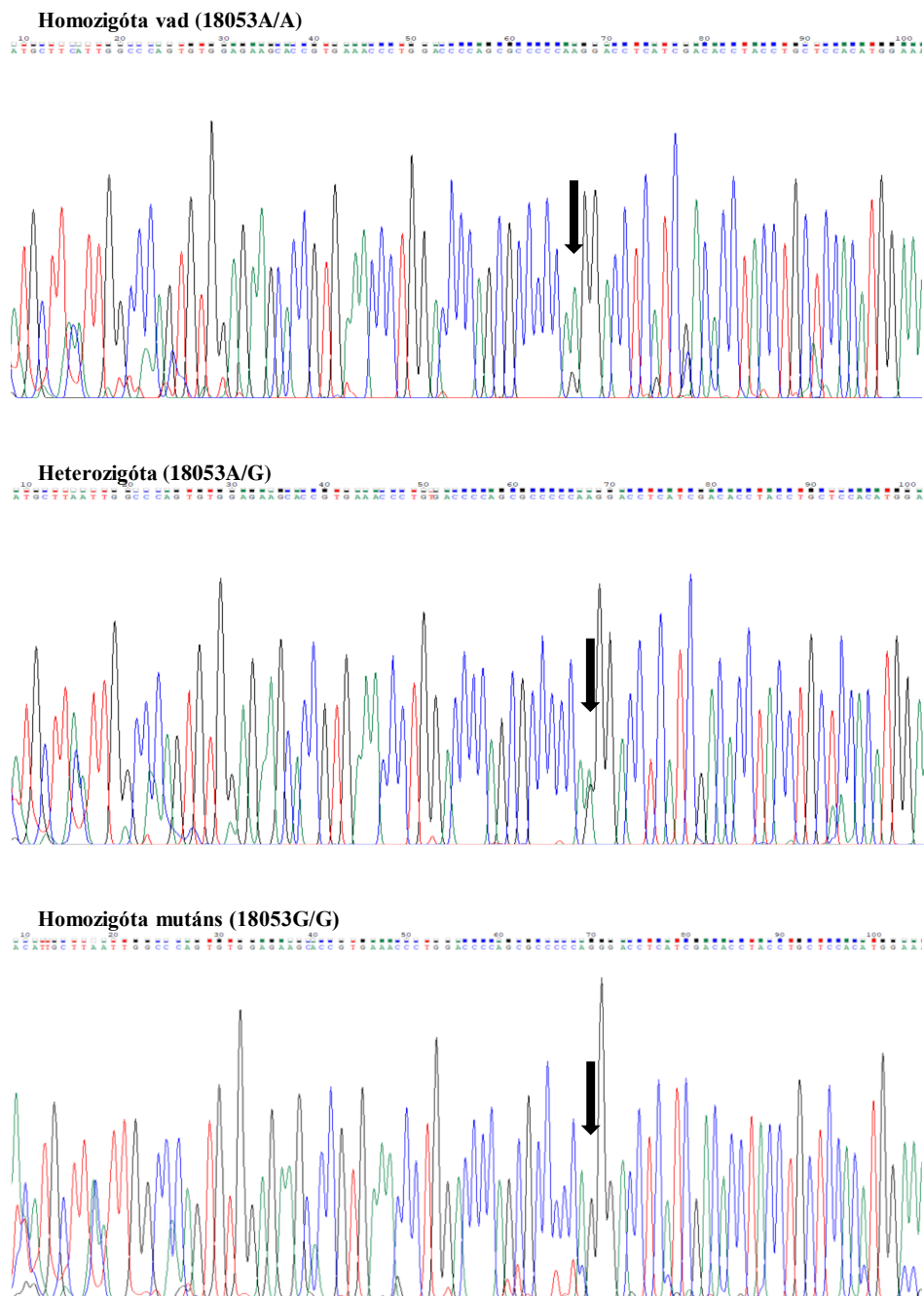
Függelék 6. táblázat: *CYP2B6* rs2279343 SNV kimutatáshoz, illetve a *CYP2B6* mRNS mennyiségi meghatározásához alkalmazott oligonukleotid szekvenciák.

<i>CYP2B6</i> rs2279343 kimutatás	Oligonukleotid	Szekvenciák (5'→3')	Amplikon hossza <sup>a</sup>
<b>1. lépés: Pre-amplifikáció</b>	Fw primer	ACA GGC TGA GGT AGA CAA TG	1275 bp
	Rev primer	CTC AGA AGG AGG TCA GAA GAC	
<b>2. lépés: TaqMan PCR</b>	Fw primer	GGC ACA CAG GCA AGT TTA CA	137 bp
	Rev primer	CTT TTT CCA TGT GGA GCA GGT AG	
	Vad próba	FAM-CGC CCC CAA GGA CCT CAT CGA CA-BHQ1	
	Mutáns próba	HEX-CGC CCC CAG GGA CCT CAT CGA-BHQ1	
<b><i>CYP2B6</i>-specifitást igazoló primerek<sup>b</sup></b>	t5b6_2 Fw primer	<u>AGT</u> TAG AGA TAC GCG GTT GGA TG	294 bp
	t5b7_2 Fw primer	TTA GAG ATG TGC AGC TGG ACA <u>T</u>	292 bp
	t5con_2 Rev primer	<u>TAT TTG</u> AGC ATG AGC AGG AAG C	
<b>mRNS expresszió</b>			
<b><i>CYP2B6</i></b>	Fw primer	AAA GCG GAG TGT GGA GGA	93 bp
	Rev primer	AAG GTG GGG TCC ATG AGG	
	Próba	FAM-AGG AGG AG-BHQ1	
<b>GAPDH (referencia)</b>	Fw primer	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	66 bp
	Rev primer	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	
	Próba	HEX-TGG GGA AGG TGA AGG TCG-BHQ1	

Fw *forward*, Rev *reverse*, FAM, HEX fluorofórok, BHQ1 *quencher* molekula

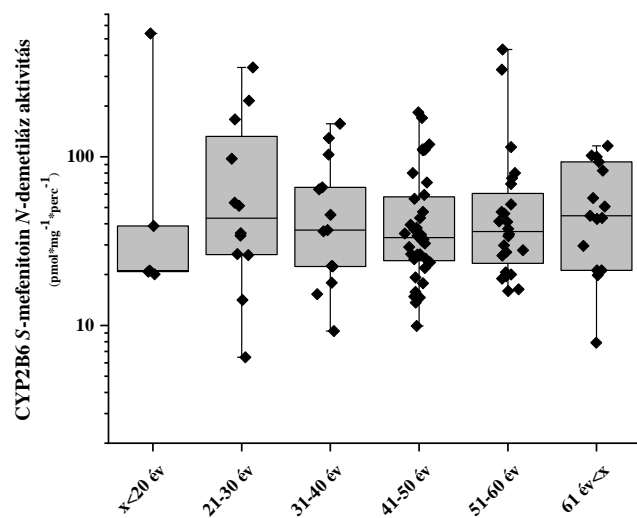
<sup>a</sup> Az amplikonok hosszát *NCBI Primer-Blast* (2023) alkalmazásával határoztuk meg.

<sup>b</sup> Az ellenőrző primerek szekvenciái Jacob és mtsai tanulmánya alapján, a módosítások aláhúzással jelölve (Jacob et al., 2004).



Függelék 1. ábra: A g.18053A>G (rs2279343) SNV kimutatás pontosságának bizonyítása homozigóta vad (18053A/A), heterozigóta (18053A/G) és homozigóta mutáns (18053G/G) minták Sanger-szekvenálásával





Függelék 2. ábra: A CYP2B6 S-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás a májszövet donorok életkorának függvényében.



OPEN

## CYP2B6 allelic variants and non-genetic factors influence CYP2B6 enzyme function

Katalin Mangó<sup>1,2</sup>, Ádám Ferenc Kiss<sup>1</sup>, Ferenc Fekete<sup>1</sup>, Réka Erdős<sup>1</sup> & Katalin Monostory<sup>1</sup>✉

Human CYP2B6 enzyme although constitutes relatively low proportion (1–4%) of hepatic cytochrome P450 content, it is the major catalyst of metabolism of several clinically important drugs (efavirenz, cyclophosphamide, bupropion, methadone). High interindividual variability in CYP2B6 function, contributing to impaired drug-response and/or adverse reactions, is partly elucidated by genetic polymorphisms, whereas non-genetic factors can significantly modify the CYP2B6 phenotype. The influence of genetic and phenocopying non-genetic factors on CYP2B6-selective activity and CYP2B6 expression was investigated in liver tissues from Caucasian subjects (N = 119). Strong association was observed between hepatic *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity and CYP2B6 mRNA expression ( $P < 0.0001$ ). In less than one third of the tissue donors, the CYP2B6 phenotype characterized by *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity and/or CYP2B6 expression was concordant with CYP2B6 genotype, whereas in more than 35% of the subjects, an altered CYP2B6 phenotype was attributed to phenocopying non-genetic factors (to CYP2B6-specific inhibitors and inducers, non-specific amoxicillin + clavulanic acid treatment and chronic alcohol consumption, but not to the gender). Furthermore, CYP2B6 genotype–phenotype mismatch still existed in one third of tissue donors. In conclusion, identifying potential sources of CYP2B6 variability and considering both genetic variations and non-genetic factors is a pressing requirement for appropriate elucidation of CYP2B6 genotype–phenotype mismatch.

### Abbreviations

CAR	Constitutive androstane receptor
CPIC	Clinical pharmacogenetics implementation consortium
Ct	Threshold cycle
CYP	Cytochrome P450
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PCR	Polymerase chain reaction
PharmVar	Pharmacogene Variation Consortium
PXR	Pregnane X receptor
SNV	Single nucleotide variation

The function of cytochrome P450 (CYP) enzymes, one of the major catalysts in drug metabolism, is significantly influenced by genetic polymorphisms leading to substantial inter-individual variability in drug response and/or adverse reactions. Although human CYP2B6 constitutes only 1–4% of hepatic CYP protein content, it is responsible for the metabolism of some clinically important drugs, including the antidepressant bupropion, the antiretroviral efavirenz, the anticancer cyclophosphamide, the analgesic ketamine and methadone<sup>1–4</sup>. *N*-Demethylation of the anticonvulsant *S*-mephenytoin to nirvanol and hydroxylation of bupropion as well as the oxidative hydroxylation of efavirenz are used as probe substrates and selective reactions for in vitro characterization of CYP2B6 activity<sup>5–7</sup>. Catalytic activity and expression of CYP2B6 are highly variable between individuals that have been reported to be primarily impacted by genetic polymorphisms of CYP2B6. The PharmVar (Pharmacogene Variation Consortium) website lists 38 alleles, several of which are associated with increased, reduced or no enzyme activity (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>, access date: 24.01.2022). Moreover, significant interethnic differences in the frequencies of clinically most relevant CYP2B6 alleles have been demonstrated<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Magyar Tudósok 2, Budapest 1117, Hungary. <sup>2</sup>Doctoral School of Pharmaceutical Sciences, Semmelweis University, Budapest, Hungary. ✉email: monostory.katalin@ttk.hu

(<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>, access date: 24.01.2022). PharmVar has published information about *CYP2B6* allele functionality and *CYP2B6* diplotype to phenotype estimation<sup>9</sup>. A standardized and easily interpreted classification of the phenotypic characteristics for each *CYP2B6* allelic variant has also been provided. *CYP2B6*\*22 variant contains a promoter mutation (rs34223104, g.-82 T > C) leading to an enhanced expression of *CYP2B6* gene through an altered transcription mechanism<sup>10</sup>. Zukunft et al.<sup>11</sup> reported increased *CYP2B6* transcription and bupropion hydroxylase activity in liver samples of *CYP2B6*\*1/\*22 heterozygous subjects. *CYP2B6*\*4 allele contains the Lys262Arg change (rs2279343, g.18053A > G) that results in a structurally altered *CYP2B6* enzyme variant and an increase in *CYP2B6* enzyme activity (efavirenz hydroxylation)<sup>9,12–14</sup>. The in vivo clearance of methadone, bupropion and efavirenz was also demonstrated to be increased in individuals carrying *CYP2B6*\*4<sup>15–17</sup>. It should be noted that *CYP2B6*\*4 allele displayed decreased metabolic activity toward cyclophosphamide comparing to *CYP2B6*\*1<sup>18</sup>. *CYP2B6*\*6 allele is defined by two single nucleotide variations (SNVs). In *CYP2B6*\*6, the same gain-of-function Lys262Arg amino acid substitution (rs2279343, g.18053A > G) was identified as in *CYP2B6*\*4. In addition, the g.15631G > T change (rs3745274, Gln172His) in *CYP2B6*\*6 alters the normal mRNA splicing process that decreases the hepatic expression of *CYP2B6* mRNA and enzyme protein, and consequently *CYP2B6* activity<sup>19</sup>. The effect of g.18053A > G change in *CYP2B6*\*4 allele seems to be reversed by the g.15631G > T in *CYP2B6*\*6<sup>18</sup>. Decreased clearance of *S*-methadone and efavirenz was reported in the presence of one or two *CYP2B6*\*6 alleles, while reduced hydroxylation of bupropion enantiomers was observed only in *CYP2B6*\*6/\*6 carriers<sup>15–17</sup>. The g.15631G > T (rs3745274, Gln172His) nucleotide substitution was detected in *CYP2B6*\*9 allele resulting in decreased enzyme activities (both bupropion and efavirenz hydroxylation) similarly to *CYP2B6*\*6<sup>20</sup>; however, information about the clinical significance of *CYP2B6*\*9 is hardly available because of its low prevalence in all populations. The g.25505C > T (rs3211371, Arg487Cys) nucleotide change in *CYP2B6*\*5 allele-variant has been reported to display mild or negligible effect on *CYP2B6* catalytic activity, although it seemed to influence the *CYP2B6* protein expression<sup>15–17,21,22</sup>.

The well-defined allele-functionality definition criteria promote the designation of clinically adaptable dosing recommendations for *CYP2B6* substrates<sup>9</sup>. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) has published the therapeutic recommendation guideline for efavirenz based on *CYP2B6* genotype distinguishing 'poor', 'intermediate', 'normal', 'rapid/ultra-rapid' *CYP2B6* metabolizer phenotypes<sup>23</sup>. The genetically determined *CYP2B6* expression and activities however are often modified by *CYP2B6* specific or non-specific non-genetic factors. Co-medication for example can decrease or even increase CYP function; therefore, phenoconversion of CYP genes should be taken into account during prediction of drug-metabolizing capacity<sup>2,24</sup>. Thiotepa, ticlopidine, clopidogrel and sertraline are well-known *CYP2B6* inhibitors resulting in substantial reduction of *CYP2B6* activities, whereas phenobarbital, rifampicin, phenytoin, dexamethasone and several corticosteroids can activate the nuclear receptors CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) upregulating *CYP2B6* transcription and increasing *CYP2B6* enzyme activity<sup>25–29</sup>. Furthermore, several studies suggested that gender is an intrinsic factor which may have a considerable impact on *CYP2B6* expression and/or activity, while others did not confirm the role of gender in *CYP2B6* function<sup>19,30–34</sup>. Medication with *CYP2B6*-selective inhibitors or inducers is one of the major causes of phenoconversion; however, certain pathological conditions and co-morbidities can also contribute to phenoconversion of drug-metabolizing enzymes<sup>35–37</sup>. Various liver diseases (alcohol-related or non-alcoholic liver diseases), cancer and other inflammatory conditions have been reported to impact the patients' drug-metabolizing capacity<sup>38,39</sup>. For appropriate estimation of *CYP2B6*-mediated drug metabolism, the evaluation of both genetic (*CYP2B6* SNVs/haplotypes) and non-genetic factors (*CYP2B6*-selective inhibitor or inducer therapy; non-specific factors: sex, morbidities, amoxicillin + clavulanic acid therapy) is required. The main aim of the present study was to investigate the potential impact of *CYP2B6* allelic variants most common in Caucasian populations on *CYP2B6* activity and mRNA expression in human liver tissues. The hepatic microsomal activity was characterized by the *CYP2B6*-selective *S*-mephenytoin *N*-demethylation. Furthermore, we attempted to identify non-genetic factors including demographic parameters and co-medication that can modify *CYP2B6* phenotype predicted from genotype.

## Materials and methods

**Human liver samples.** Human liver tissues (N = 119) were obtained from donated organs at the Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University (Budapest, Hungary). The study was approved by the Hungarian Committee of Science and Research Ethics, Medical Research Council (125/PI/2011, 4799-0/2011EKU), and 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). The subjects' demographic and clinical data (sex, age, cause of death, acute and chronic medication prior the explantation, smoking and alcohol consumption status) were recorded (Supplementary Table 1). Liver tissues from those subjects who were recorded chronic alcohol consumption [N = 11] were evaluated to be fibrotic due to alcohol related liver disease. Human livers were perfused with Euro-Collin's solution (Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg vdH, Germany) and excised. The tissues (approximately 1 g) were homogenized in 0.1 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM EDTA and 154 mM KCl. Microsomal fraction was isolated by differential centrifugation and protein content of microsomes was determined by the method of Lowry et al. using bovine serum albumin as the standard<sup>40,41</sup>. Approximately 50 mg of liver tissue were homogenized in TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. The hepatic RNA samples were stored in ultra-pure water containing 0.1% diethylpyrocarbonate at –80 °C for further analyses.

***CYP2B6* enzyme activity assay.** The *S*-mephenytoin *N*-demethylation activity selective for *CYP2B6* were performed in the incubation mixture containing NADPH-generating system (1 mM NADPH, 10 mM

<i>CYP2B6</i> rs2279343 analysis	Oligonucleotides	Sequences (5' → 3')	Length of amplicons <sup>a</sup>
Step 1: 'nested' PCR	Fw primer	ACA GGC TGA GGT AGA CAA TG	1275 bps
	Rev primer	CTC AGA AGG AGG TCA GAA GAC	
Step 2: TaqMan PCR	Fw primer	GGC ACA CAG GCA AGT TTA CA	137 bps
	Rev primer	CTT TTT CCA TGT GGA GCA GGT AG	
	W probe	FAM-CGC CCC CAA GGA CCT CAT CGA CA-BHQ1	
	M probe	HEX-CGC CCC CAG GGA CCT CAT CGA-BHQ1	
Verifying primers for <i>CYP2B6</i> specificity <sup>b</sup>	t5b6_2 Fw primer	<b>AGT TAG AGA TAC GCG GTT GGA TG</b>	294 bps
	t5b7_2 Fw primer	TTA GAG ATG TGC AGC TGG ACA T	292 bps
	t5con_2 Rev primer	<b>TAT TTG AGC ATG AGC AGG AAG C</b>	
<b>mRNA expression</b>			
<i>CYP2B6</i>	Fw primer	AAA GCG GAG TGT GGA GGA	93 bps
	Rev primer	AAG GTG GGG TCC ATG AGG	
	Probe	FAM-AGG AGG AG-BHQ1	
GAPDH (reference)	Fw primer	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C	66 bps
	Rev primer	GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	
	Probe	HEX-TGG GGA AGG TGA AGG TCG-BHQ1	

**Table 1.** Oligonucleotide sequences for the *CYP2B6* rs2279343 SNV analysis and *CYP2B6* mRNA expression quantification. *Fw* forward, *Rev* reverse, *W* wild, *M* mutant, FAM, HEX fluorophores, BHQ1 quencher. <sup>a</sup>Length of amplicons were determined by NCBI Primer Blast. <sup>b</sup>Sequences of verifying primers based on Jacob et al.<sup>45</sup> with slight modifications (in bold).

glucose-6-phosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase), human liver microsomes (0.8 mg/ml protein) and *S*-mephenytoin (1 mM). After 40-min incubation at 37 °C, the enzyme reactions were terminated by ice-cold acetonitrile, and the incubation mixtures were centrifuged at 10,000×*g* for 10 min. Formation of nirvanol was quantified by high-performance liquid chromatography according to Heyn et al.<sup>5</sup>. *CYP2B6* enzyme assay for each donor was performed in triplicate, and the activity was expressed as pmol nirvanol\*(mg protein)<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>.

***CYP2B6* genotyping.** Genomic DNA templates were isolated from liver tissues using Quick-DNA Mini-prep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, CA). The following *CYP2B6* polymorphisms were determined using validated TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific) for g.-82 T>C (rs34223104, C\_27830964\_10), g.15631G>T (rs3745274, C\_7817765\_60) and g.25505C>T (rs3211371, C\_30634242\_40). Each reaction (in 5-μl reaction volume) contained Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific), 10–15 ng genomic DNA sample and nuclease-free water and incubated at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min; and in 50 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. For identification of g.18053A>G nucleotide substitution (rs2279343), no validated PCR (polymerase chain reaction) primers and probes are commercially available; therefore, a two-step PCR assay based on the 'nested' PCR method with 'touchdown' thermal cycling protocol and the TaqMan PCR was developed (Supplementary Fig. 1A)<sup>42,43</sup>. In the PCR reactions, two sets of primer pairs were applied and used consecutively to increase the *CYP2B6* specificity of the SNV-discrimination and to avoid the amplification of *CYP2B7P* (Table 1). The first step was a 'nested' PCR containing PCRBIOS VeriFi Master Mix (PCR Biosystems Ltd., London, UK), 400–400 nM forward and reverse primers (first set of primer pairs, Table 1) and 40–50 ng genomic DNA template. The first primer pair generated a relatively long (1275-bp) amplicon containing the whole *CYP2B6* exon 5 and exon 6 with the intron 5 in between and with some short surrounding upstream and downstream intron region sequences (Supplementary Fig. 1A). The homology of *CYP2B6* intron sequences with *CYP2B7P* is somewhat lower than that of the exons<sup>44</sup>; therefore, the first primer pair designed for the upstream and downstream intron regions (in introns 4 and 6) with the 'touchdown' PCR thermal cycling protocol was expected to provide the *CYP2B6* gene specific hybridization of the primers. The thermal cycling protocol was performed according to the principles of 'touchdown' PCR: 95 °C for 1 min and 10 cycles of 95 °C for 15 s, 72–62 °C for 15 s (decreasing 1 °C/cycle), 72 °C for 1 min, and 10 cycles of 95 °C for 15 s, 62 °C for 15 s, 72 °C for 1 min. During the initial cycle, an annealing temperature (72 °C) higher than the targeted melting temperature of primers (62 °C) was used. Afterwards, the annealing temperature was decreased progressively over 10 cycles which made the reaction conditions more permissive. Theoretically, each cycle with decreasing annealing temperature by 1 °C produced four-fold exponential differences between correct and incorrect annealing resulting in the enrichment of the *CYP2B6* specific over the non-target *CYP2B7P* specific product<sup>42</sup>. For testing *CYP2B6* specificity of the 'nested' PCR reaction, the three verifying primers designed by Jacob et al. were modified: (1) a *CYP2B6* specific (t5b6\_2) forward primer, (2) a *CYP2B7P* specific (t5b7\_2) forward primer and (3) a common (t5con\_2) reverse primer (Table 1)<sup>45</sup>. The optimization of the length, GC-content and the melting temperatures of these verifying primers provided more suitable reaction conditions than those published by Jacob et al.<sup>45</sup>.

Using genomic DNA or DNA amplicon produced in the ‘nested’ PCR as the template, great differences in Ct (threshold cycle) values were observed between *CYP2B6* and *CYP2B7P* specific products (Ct for genomic DNA: 23.1 and 24.1 vs. Ct for DNA amplicon: 23.1 and 37.04) (Supplementary Fig. 1B). It confirmed that substantial amount of *CYP2B6* specific amplicon (more than 5000-fold) was produced in the ‘nested’ PCR comparing to *CYP2B7P* specific amplicon, whereas for *CYP2B6*-selective amplification, the genomic DNA appeared to be not an appropriate template. The second PCR was carried out using Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 300–300 nM forward and reverse primers (second set of primer pairs), 200–200 nM ‘wild’ and ‘mutant’ TaqMan probes (Table 1) and the 100-fold dilution of the ‘nested’ PCR product as the template. The incubation protocol was 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 50 cycles of 95 °C for 15 s, 66 °C for 1 min. The second primer pair generating a short, 137-bp amplicon with the rs2279343 mutation site in exon 5 and TaqMan probes designed for the wild-type and the mutant type of rs2279343 were used for SNV-discrimination (Supplementary Fig. 1C). The *in silico* design and validation of the primers and probes (Table 1) were performed by IDT Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, access date: 24.01.2022), NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, access date: 24.01.2022) and NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, access date: 24.01.2022) software tools. The oligonucleotides were synthesized by Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Germany). The length of the amplicons in each reaction was verified using the TapeStation 4200 instrument (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). The *CYP2B6* specificity of the first ‘nested’ PCR step was confirmed by using *CYP2B6* and *CYP2B7P* gene specific forward primers and a common reverse primer (Table 1) with SYBR Green detection. The accuracy of SNV-discrimination of homozygous wild-type (g.18053A/A), heterozygous (g.18053A/G) and homozygous mutant type (g.18053G/G) samples was confirmed by Sanger-sequencing (Eurofins Genomics Germany GmbH) (Supplementary Fig. 2).

**Analysis of *CYP2B6* mRNA expression by quantitative real-time PCR.** Hepatic RNA samples (3 µg) were reverse transcribed into cDNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). The real-time PCR was performed by KAPA Probe Fast qPCR Master Kit™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and UPL probes for *CYP2B6* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The SNV g.15631G>T (rs3745274) is associated with an aberrant mRNA splicing variant lacking exons 4 to 6 and entailing reduced *CYP2B6* function<sup>19</sup>. Our aim was to detect only the full-length *CYP2B6* mRNA and to distinguish it from the aberrant splicing variant; therefore, the primer pair for *CYP2B6* expression assay was designed to the exons 3 and 4 (forward and reverse primers, respectively), and the intron-spanning amplicon detected exclusively the functional full-length mRNA variant (Table 1). The quantity of the target mRNA relative to that of the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was determined. The sequences of primers and probes used for the real-time PCR analyses of *CYP2B6* and GAPDH expression are shown in Table 1.

**Data analysis.** The frequency distribution of *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity was determined in liver tissue samples, and three categories (low, intermediate and high) were distinguished for poor, intermediate and extensive metabolizers (PM, IM and EM). Liver tissue samples were screened for *CYP2B6* polymorphisms (*CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9 and *CYP2B6*\*22). *CYP2B6* allele discrimination was performed by Bio-Rad CFX Maestro Software 1.1 (v4.1.2433.1219; Bio-Rad Laboratories), and *CYP2B6* haplotypes were estimated by PHASE software v2.1.1.<sup>46,47</sup> To improve the accuracy of haplotype estimation, the *CYP2B6* genotype data of 44 patients studied by Dobrinas et al. were used in addition to the data obtained in the present study<sup>48</sup>. InStat v3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was used for analysing the associations between *CYP2B6* activity and gender, *CYP2B6* genotypes and *CYP2B6* activity or mRNA expression as well as *CYP2B6* mRNA expression and activity using Kruskal–Wallis ANOVA followed by Dunn’s multiple comparisons test. Phenocopy frequencies were evaluated on the basis of the frequencies of the non-genetic factors (medication, chronic alcohol consumption) in the medical histories of tissue donors in various genotype-based phenotype groups by Fisher’s exact test. Linear regression models were formulated to test potential associations between *CYP2B6* activity (N=105) or mRNA expression (N=93) as dependent variables and *CYP2B6* SNVs, haplotypes, sex, chronic alcohol consumption and medications (*CYP2B6* inducer therapy, amoxicillin + clavulanic acid therapy) as co-variables. Multiple linear regression analyses were carried out by IBM SPSS Statistics software [v28.0.1.0 (142), IBM Corp., Armonk, NY]. *P* value < 0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

**Genetic variability of *CYP2B6*.** Liver tissues (N=119) were screened for the g.-82 T>C (rs34223104), g.15631G>T (rs3745274), g.18053A>G (rs2279343) and g.25505C>T (rs3211371) SNVs of *CYP2B6* using real-time PCR analyses, and *CYP2B6* haplotypes were identified for *CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*5, *CYP2B6*\*6, *CYP2B6*\*9 and *CYP2B6*\*22. A novel method based on ‘nested’ PCR using ‘touchdown’ PCR thermal protocol and SNV-discrimination using TaqMan probes was developed for identification of g.18053A>G<sup>42,43</sup>. The wild-type *CYP2B6*\*1 allele was assigned to g.-82 T/15631G/18053A/25505C haplotype. The most prevalent alleles were *CYP2B6*\*6 and *CYP2B6*\*5, whereas *CYP2B6*\*4, *CYP2B6*\*9 and *CYP2B6*\*22 occurred with much lower frequencies (Table 2). According to the phenotype prediction by PharmVar (Table 3), half of the tissue donors carrying *CYP2B6*\*1/\*1 or *CYP2B6*\*1/\*5 genotypes (38.7% or 12.6%) (Table 2) were considered to be ‘normal’ metabolizers. More than one third (36.1%) of the subjects with one normal and one decreased function alleles (*CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9 and *CYP2B6*\*4/\*6 genotypes) were ‘intermediate’ metabolizers. Those donors with two loss-of-function alleles (*CYP2B6*\*6/\*6 and *CYP2B6*\*6/\*9 genotypes) were referred to be ‘poor’ metabolizers (7.5%), whereas an additional group carrying one normal and one gain-of-function alleles

	N	Frequency (%)	
		Tissue donors	Caucasian populations <sup>a</sup>
<b>CYP2B6 alleles</b>			
*4	5	2.1	2.2–6.2
*5	25	10.5	9–12.2
*6	59	24.8	7–28.15
*9	2	0.8	0–1.47
*22	2	0.8	1.4–2.4
<b>CYP2B6 genotypes</b>			
*1/*1	46	38.7	21.05–24.1
*1/*6	32	26.9	22.1–22.9
*1/*5	15	12.6	7.36–11.3
*5/*6	9	7.6	5.3–7.36
*6/*6	8	6.7	5.4–7.36
*1/*4	3	2.5	1.05–4
*1/*22	2	1.7	1.3–2.1
*1/*9	1	0.8	<1.4
*6/*9	1	0.8	<0.8
*4/*5	1	0.8	<0.9
*4/*6	1	0.8	<2.1

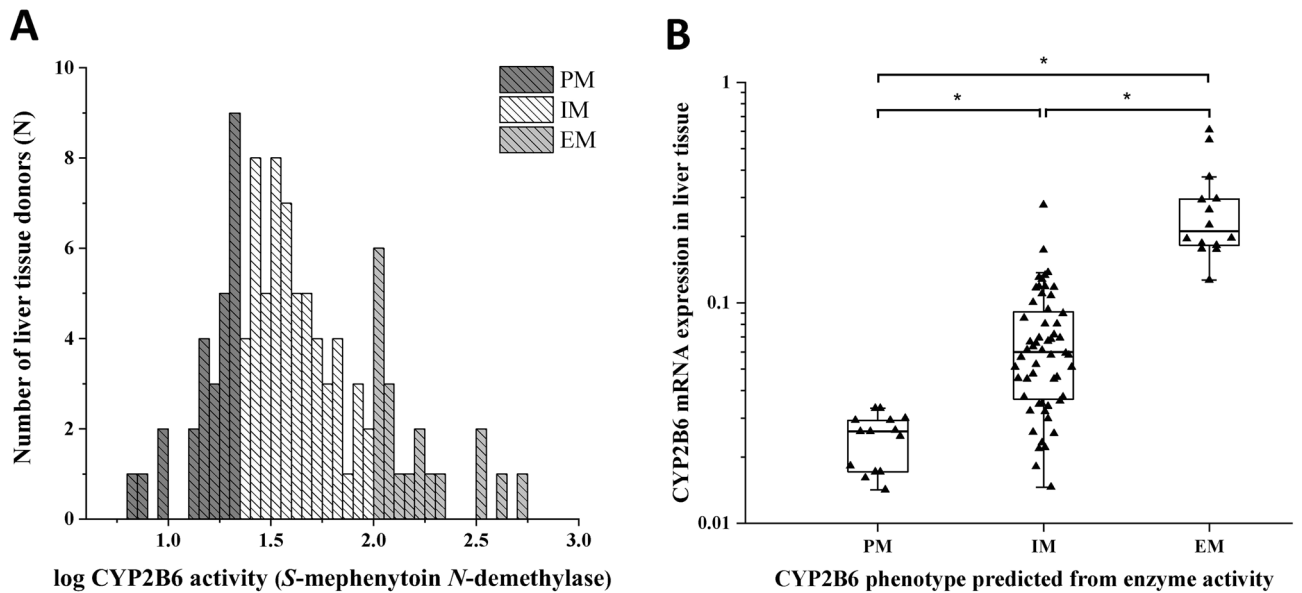
**Table 2.** CYP2B6 allele and genotype frequencies in liver tissue donors and in Caucasian populations. <sup>a</sup>Based on PharmVar (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>)<sup>8</sup>.

CYP2B6 genotype	CYP2B6 phenotype		Phenoconversion		
	CYP2B6 genotype-based prediction <sup>a</sup>	CYP2B6 activity categories	medication with CYP2B6 inducer <sup>b</sup>	medication with CYP2B6 inhibitor <sup>c</sup>	non-specific non-genetic factors <sup>d</sup>
*6/*6 *6/*9	Poor	PM	IM-EM	PM	PM
*1/*6 *5/*6 *1/*9 *4/*6	Intermediate	low IM	high IM-EM	PM	PM
*1/*1 *1/*5	Normal	high IM	EM	low IM-PM	low IM-PM
*1/*4 *1/*22 *4/*5	Rapid/ Ultrarapid	EM	EM	high IM	high IM

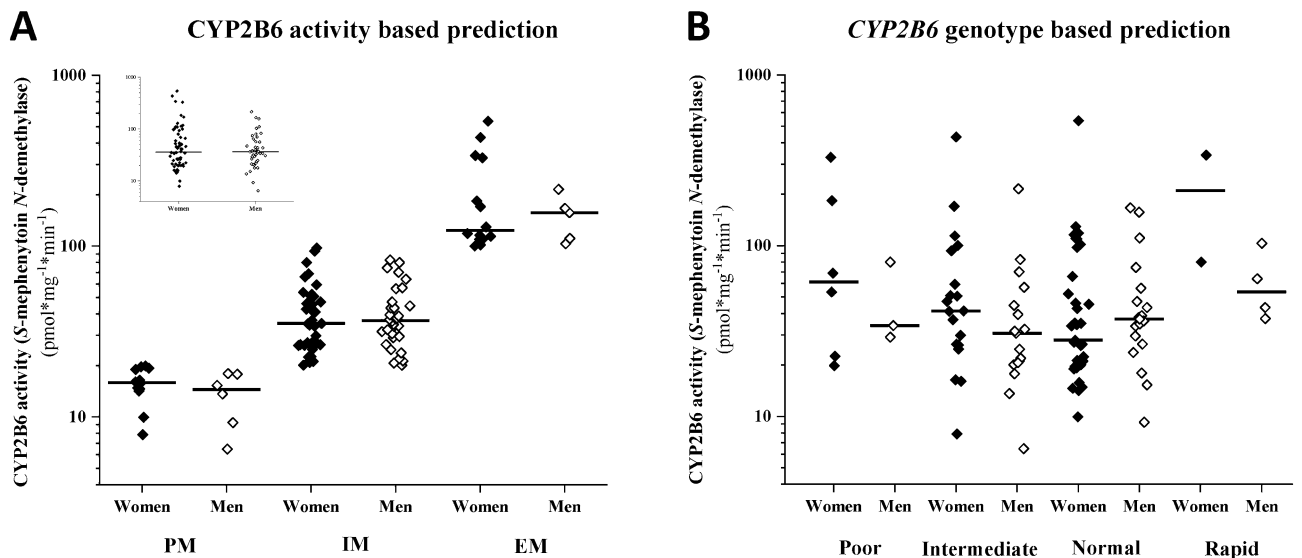
**Table 3.** Genotype-based prediction of CYP2B6 metabolizer phenotypes according to PharmVar and phenoconversion by non-genetic factors. *PM* poor metabolizer, *IM* intermediate metabolizer, *EM* extensive metabolizer. <sup>a</sup>According to the CPIC. <sup>b</sup>CYP2B6 inducers: dexamethasone, methylprednisolone, prednisolone, hydrocortisone, cortisone, midazolam, felodipine, diazepam. <sup>c</sup>CYP2B6 inhibitor: amlodipine. <sup>d</sup>Non-specific factors: chronic alcohol consumption, amoxicillin + clavulanic acid therapy.

(CYP2B6\*1/\*4, CYP2B6\*1/\*22 and CYP2B6\*4/\*5 genotypes) were distinguished to be 'rapid/extensive' metabolizers (5%) (Tables 2 and 3).

**Hepatic CYP2B6 activity and mRNA expression.** Hepatic microsomal *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity selective for CYP2B6 was determined in 105 tissue donors. CYP2B6 activities varied from 6.47 to 538.3 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>, representing approximately 85-fold variability and showed skewed distribution (Fig. 1A). Low, intermediate and high activities were distinguished using the cut-off values of 20 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> and 99.9 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup> for poor, intermediate and extensive metabolizers. Approximately two thirds of the liver tissues (65%) displayed intermediate *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity, whereas of 105 tissue donors, 18 and 19 showed low and extensive CYP2B6 activities, respectively. Furthermore, significant differences in hepatic CYP2B6 mRNA expression were observed between various CYP2B6 activity groups (N = 84, *P* < 0.0001) (Fig. 1B). Demographic parameters, such as age (data not shown) or sex (Fig. 2, Table 4), appeared not to influence CYP2B6 activity. No significant differences between men and women were observed in *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity, and the distribution of men and women in the activity categories or in genotype-based categories were found to be homogenous (Fig. 2A,B).



**Figure 1.** Frequency distribution of hepatic CYP2B6 activities (*S*-mephenytoin *N*-demethylation) (N = 105) (A) and association between CYP2B6 activities and mRNA expression (N = 85) (B) in human tissue donors. PM poor metabolizer; IM intermediate metabolizer; EM extensive metabolizer. \* Significant difference (P < 0.0001).



**Figure 2.** Gender-based differences in *S*-mephenytoin *N*-demethylation between various CYP2B6 metabolizer groups (A) and between *CYP2B6* genotype groups (B). The inserted graph (A) displays the differences in CYP2B6 activities between men and women.

**Effect of genetic and non-genetic factors on hepatic CYP2B6 activities.** For appropriate comparison, the activity-based (poor-intermediate-extensive) and genotype-based phenotype categories (poor-intermediate-normal-rapid) were harmonized. Using the median activity (36.17 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) as the cut-off value, the intermediate activity category was divided into low- and high-intermediate activities corresponding to the 'intermediate' and 'normal' genotype-based phenotype categories (Table 3, Fig. 3A). Several *CYP2B6* allelic variants have been reported to significantly modify CYP2B6 activity<sup>9</sup>. The *CYP2B6* genotype-based phenotype prediction however seemed to be not completely consistent with the activity-based categories in liver tissue donors (N = 105). Therefore, the impact of non-genetic factors (medication, chronic alcohol consumption) on CYP2B6-selective *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity was also investigated. The CYP2B6 inducers (dexamethasone, methylprednisolone, prednisolone, hydrocortisone, cortisone, midazolam, felodipine, diazepam) and the CYP2B6-selective inhibitor amlodipine as well as non-specific non-genetic factors (amoxicillin + clavulanic acid therapy, alcohol consumption) that can increase or decrease CYP2B6 expression and/or function were assumed to result in modification of the genetically determined CYP2B6 activity (Table 3)<sup>25,49-57</sup>.

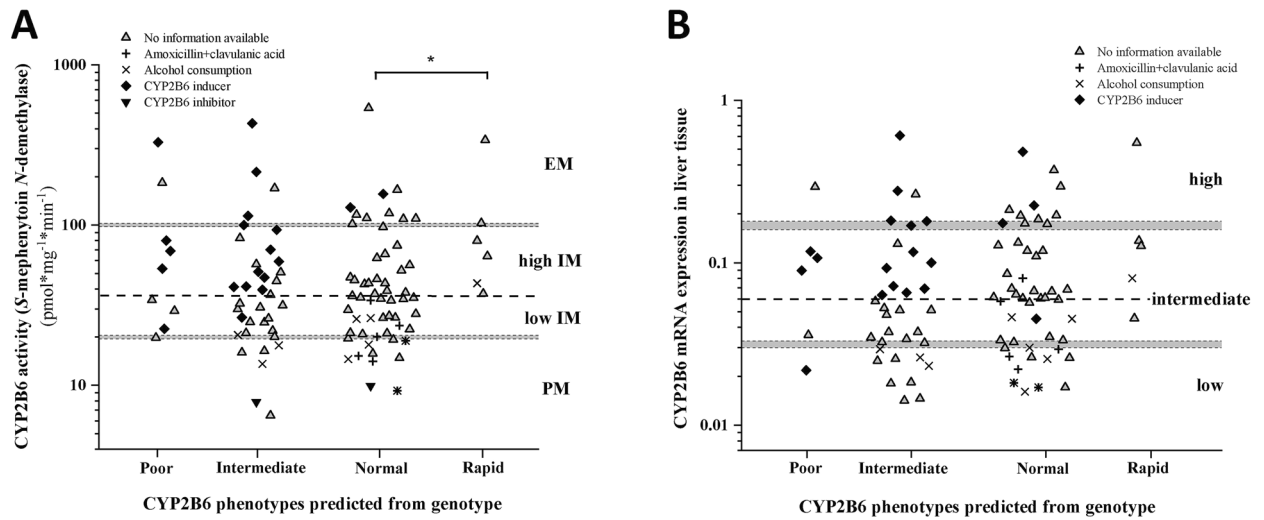
Of the 9 genetically 'poor' metabolizer subjects with two loss-of-function alleles (*CYP2B6*\*6/\*6 or *CYP2B6*\*6/\*9 genotypes), only one displayed poor metabolism of *S*-mephenytoin, whereas the CYP2B6 activity

Variable	CYP2B6 activity			CYP2B6 mRNA expression		
	Coefficient B (SE)	Coefficient $\beta$	P value	Coefficient B (SE)	Coefficient $\beta$	P value
<b>SNVs, non-genetic</b>						
Constant	67.09 (13.86)		<0.001	0.12 (0.02)		<0.001
g.-82 T>C (rs34223104)	32.10 (56.79)	0.054	0.57	0.02 (0.07)	0.021	0.82
g.15631G>T (rs3745274)	-79.98 (38.01)	-0.485	<b>0.03</b>	-0.16 (0.05)	-0.728	<b>0.004</b>
g.18053A>G (rs2279343)	63.33 (36.59)	0.386	0.08	0.11 (0.05)	0.496	<b>0.04</b>
g.25505C>T (rs3211371)	8.69 (18.76)	0.044	0.64	-0.04 (0.03)	-0.124	0.19
Sex	-15.34 (16.01)	-0.092	0.34	-0.01 (0.02)	-0.052	0.59
Alcohol consumption	-33.12 (26.75)	-0.119	0.21	-0.06 (0.03)	-0.174	0.07
Amoxicillin/clavulanic acid therapy	-35.03 (28.38)	-0.120	0.22	-0.06 (0.04)	-0.148	0.14
Inducer therapy	65.90 (22.73)	0.311	<b>0.005</b>	0.11 (0.03)	0.391	< <b>0.001</b>
<b>Haplotype, non-genetic 1</b>						
Constant	67.09 (13.89)		<0.001	0.12 (0.02)		<0.001
g.-82 T/15631G/ <b>18053G</b> /25505C	73.03 (41.42)	0.171	0.08	0.09 (0.05)	0.172	0.08
g.-82 T/15631G/18053A/ <b>25505 T</b>	8.81 (18.84)	0.045	0.64	-0.03 (0.03)	-0.122	0.21
g.-82 T/ <b>15631 T</b> / <b>18053G</b> /25505 T	-15.60 (17.82)	-0.094	0.38	-0.05 (0.02)	-0.245	<b>0.02</b>
g.-82 T/ <b>15631 T</b> /18053A/25505C	-47.28 (59.30)	-0.079	0.43	-0.08 (0.07)	-0.111	0.27
g.- <b>82C</b> /15631G/18053A/25505C	33.12 (56.92)	0.055	0.56	0.02 (0.07)	0.022	0.82
Sex	-17.38 (16.16)	-0.105	0.29	-0.02 (0.02)	-0.077	0.44
Alcohol consumption	-33.37 (26.81)	-0.120	0.21	-0.06 (0.03)	-0.164	0.09
Amoxicillin/clavulanic acid therapy	-34.20 (28.48)	-0.117	0.22	-0.06 (0.04)	-0.148	0.14
Inducer therapy	66.31 (23.41)	0.313	<b>0.006</b>	0.11 (0.03)	0.398	< <b>0.001</b>
<b>Haplotype, non-genetic 2</b>						
Constant	67.30 (13.70)		<0.001	0.12 (0.02)		<0.001
g.-82 T/15631G/ <b>18053G</b> /25505C	74.52 (40.75)	0.175	0.07	0.09 (0.05)	0.177	0.07
g.-82 T/15631G/18053A/ <b>25505 T</b>	9.34 (18.65)	0.047	0.62	-0.03 (0.03)	-0.117	0.22
g.-82 T/ <b>15631 T</b> / <b>18053G</b> /25505 T	-14.97 (17.53)	-0.090	0.39	-0.05 (0.02)	-0.240	<b>0.02</b>
g.-82 T/ <b>15631 T</b> /18053A/25505C	-46.98 (58.90)	-0.079	0.43	-0.08 (0.07)	-0.111	0.27
g.- <b>82C</b> /15631G/18053A/25505C	32.85 (56.52)	0.055	0.56	0.02 (0.07)	0.022	0.82
Sex	-17.25 (16.04)	-0.104	0.29	-0.02 (0.02)	-0.073	0.46
Activity reducing factors <sup>a</sup>	-41.08 (21.40)	-0.195	<b>0.05</b>	-0.07 (0.02)	-0.236	<b>0.02</b>
Activity increasing factors	65.41 (23.29)	0.308	<b>0.006</b>	0.11 (0.03)	0.395	< <b>0.001</b>

**Table 4.** Multivariate analysis on CYP2B6 activity (*S*-mephenytoin *N*-demethylation) considering genetic (*CYP2B6* SNVs or haplotypes) and non-genetic factors. <sup>a</sup>Non-genetic factors: chronic alcohol consumption, amoxicillin + clavulanic acid therapy. In haplotypes, the polymorphic variants are indicated in bold. The *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant and are indicated in bold.

was considered to be low/high-intermediate or even extensive in 8 tissue donors (Fig. 3A). In the medical history of these 8 donors, CYP2B6 inducer therapy (methylprednisolone, dexamethasone, diazepam) as the non-genetic factor explained the elevated activity in 5 tissue donors. According to the PharmVar, ‘intermediate’ metabolizers carrying *CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9 or *CYP2B6*\*4/\*6 genotypes are expected to have low-intermediate metabolism of *S*-mephenytoin. However, CYP2B6 activities in genetically ‘intermediate’ metabolizer tissue donors (*N* = 36) ranged from poor (6.47 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) to extensive *S*-mephenytoin *N*-demethylation (432.7 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>). Poor activity was attributed to CYP2B6 inhibitor (amlodipine) therapy and chronic alcohol consumption in 3 subjects, whereas CYP2B6 inducer therapy was frequently reported in the clinical history of the tissue donors with high-intermediate and extensive CYP2B6 activity (12/18 in high-intermediate/extensive metabolizers versus 1/12 in low-intermediate metabolizers, OR: 22, 95% CI: 2.27–213, *P* = 0.0024) (Fig. 3A). Most of the tissue donors carrying *CYP2B6*\*1/\*1 or *CYP2B6*\*1/\*5 genotypes (‘normal’ metabolizers, *N* = 54) were predicted to display high-intermediate CYP2B6 activity; however, their *S*-mephenytoin *N*-demethylase activities ranged from poor (the lowest 9.25 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) to extensive metabolism (the highest 538.3 pmol\*mg<sup>-1</sup>\*min<sup>-1</sup>) (Fig. 3A). Despite the *CYP2B6*\*1/\*1 or *CYP2B6*\*1/\*5 genotypes, 30 tissue donors displayed lower CYP2B6 activity (poor or low-intermediate activity) than predicted from the genotype. The activity reducing non-genetic factors (CYP2B6 inhibitor amlodipine; non-specific amoxicillin + clavulanic acid therapy and chronic alcohol consumption) in the medical history was frequently indicated in the subjects with poor or low-intermediate activities (12/30 in poor/low-intermediate metabolizers versus 0/14 in high-intermediate, OR: 19.6, 95% CI: 1.07–359.6, *P* = 0.0084). Of the 10 extensive metabolizers, 2 were on CYP2B6 inducer therapy (methylprednisolone, midazolam) that confirmed the high CYP2B6 activity. ‘Rapid’ metabolizer phenotype predicted from the genotype (*CYP2B6*\*1/\*4, *CYP2B6*\*1/\*22 or *CYP2B6*\*4/\*5) was identified in 6 tissue donors;





Subjects with non-genetic factors/no information				
Activity based	Poor	Intermediate	Normal	Rapid
All (N)	9	36	54	6
PM	1	3/3	}12/18	}1/3
Low IM	}5/3	12		
High IM		14		
EM	}12/6	2/8	2	

Subjects with non-genetic factors/no information				
mRNA based	Poor	Intermediate	Normal	Rapid
All (N)	6	34	48	5
low	1	3/6	}11/11	}1/3
low intermediate	}3/2	11		
high intermediate		16		
high	}12/2	3/7	1	

**Figure 3.** Hepatic CYP2B6 activity (*S*-mephenytoin *N*-demethylation) (A) and CYP2B6 expression (B) in subjects belonging to various *CYP2B6* genotype groups. Non-genetic factors (CYP2B6 inducer and inhibitor therapy, amoxicillin + clavulanic acid treatment, chronic alcohol consumption) found in clinical reports of the tissue donors are indicated. The median CYP2B6 activity (dotted line) is for the cutoff value between high- and low-intermediate metabolizers. Tables provide the number of subjects in each metabolizer groups with the information of relevant non-genetic factors. *PM* poor metabolizer, *IM* intermediate metabolizer, *EM* extensive metabolizer, low low expression; intermediate intermediate expression; high high expression. *CYP2B6* genotype groups: Poor *CYP2B6*\*6/\*6, *CYP2B6*\*6/\*9; Intermediate: *CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9, *CYP2B6*\*4/\*6; Normal: *CYP2B6*\*1/\*1, *CYP2B6*\*1/\*5; Rapid: *CYP2B6*\*1/\*4, *CYP2B6*\*1/\*22, *CYP2B6*\*4/\*5. \**P* < 0.05.

however, only 2 displayed extensive *S*-mephenytoin *N*-demethylation, and in the medical history of one subject, chronic alcohol consumption appeared to be responsible for high-intermediate metabolism. In conclusion, *CYP2B6* genetic polymorphisms explained *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity in not more than 29 tissue donors (27.6%), and considering non-genetic factors improved the phenotype prediction by further 33.3% (35 tissue donors); however, in the medical history of 41 subjects, no relevant information on the non-genetic factors for altered *CYP2B6* metabolism was found. It also means that phenoconverting non-genetic factors in these 41 subjects could not confirm altered *CYP2B6* phenotype predicted from genotype, and genotype–phenotype mismatch still existed in 39.1% (41/105) of the subjects.

**Effect of genetic and non-genetic factors on hepatic CYP2B6 mRNA expression.** The nucleotide change g.-82 T > C (rs34223104) has been reported to be associated with increased expression of CYP2B6 mRNA, whereas g.15631G > T (rs3745274) is associated with an aberrant mRNA splicing variant lacking exons 4 to 6 and entailing reduced CYP2B6 function or reduced expression of the full-length CYP2B6 mRNA variant<sup>11,19</sup>. In the present study (N = 93), we evaluated the association of hepatic CYP2B6 expression with *CYP2B6* genotypes as well as with non-genetic phenoconverting factors, such as CYP2B6 inducer therapy (diazepam, dexamethasone, methylprednisolone, felodipine, cortisone, midazolam), non-specific amoxicillin + clavulanic acid therapy and chronic alcohol consumption (Fig. 3B).

Low CYP2B6 mRNA expression was expected in those individuals (N = 6) carrying two loss-of-function alleles (*CYP2B6*\*6/\*6 and *CYP2B6*\*6/\*9 genotypes) because of the truncated CYP2B6 splicing variant. However, there was more than tenfold difference between the lowest (0.02179) and highest (0.2932) mRNA expression. In the medical history of 3 subjects with high-intermediate expression and surprisingly of one with low expression, CYP2B6 inducer therapy (4/6; diazepam, dexamethasone, methylprednisolone) was indicated. The ‘intermediate’ genotype-based phenotype category was applied for those subjects with one normal function and one loss-of-function alleles (*CYP2B6*\*1/\*6, *CYP2B6*\*5/\*6, *CYP2B6*\*1/\*9, *CYP2B6*\*4/\*6 genotypes), and was predicted to display low-intermediate CYP2B6 mRNA expression (N = 34). In fact, we found high variability (42-fold) between

the lowest and the highest mRNA expressions (0.01418 and 0.60709). The low CYP2B6 expression in 3 liver tissue samples was explained by chronic alcohol consumption (3/9 in low expressers vs. 0/11 in low-intermediate expressers, OR: 12.39; 95% CI: 0.549–279.4;  $P=0.073$ ). Treatment with CYP2B6 specific inducers (felodipine, cortisone, methylprednisolone) was recorded in the majority of tissue donors with high or high-intermediate mRNA expression (12/14 in high/high-intermediate vs. 0/11 in low-intermediate; OR: 115; 95% CI: 4.973–2659.5;  $P<0.0001$ ). The subjects with two normal function alleles (*CYP2B6*\*1/\*1 and *CYP2B6*\*1/\*5 genotypes) were estimated to have high-intermediate mRNA expression ( $N=48$ ). However, we found several tissue donors with CYP2B6 expression different from genotype-based prediction, with low and low-intermediate as well as with high CYP2B6 mRNA levels (22/48 and 10/48). Phenoconverting effect of amoxicillin + clavulanic acid therapy and/or chronic alcohol consumption explained low and low-intermediate mRNA expression in half of the liver tissues (11/22 in low and low-intermediate versus 1/16 in high-intermediate; OR: 15; 95% CI: 1.678–134.1;  $P=0.0051$ ). In the medical history of 3 tissue donors with high mRNA expression (3/10), CYP2B6 inducer therapy (methylprednisolone, midazolam, dexamethasone) was recorded (3/10 high expressers versus 0/16 in high-intermediate; OR: 15.4, 95% CI: 0.703–337.5,  $P=0.0462$ ). Although the individuals with one normal and one gain-of-function alleles ( $N=5$ ; *CYP2B6*\*1/\*4 and *CYP2B6*\*1/\*22 genotypes) were predicted to display ‘rapid’ metabolizer phenotype, *CYP2B6*\*22 carriers were expected to have high CYP2B6 mRNA expression (2/5). Four tissue donors (2 with *CYP2B6*\*1/\*4 and 2 with *CYP2B6*\*1/\*22) expressed CYP2B6 at low-intermediate and high-intermediate levels, and only one subject with *CYP2B6*\*1/\*4 genotype was high CYP2B6 expresser (1/5). Chronic alcohol consumption was recorded for one tissue donor with *CYP2B6*\*1/\*4 genotype. In conclusion, CYP2B6 mRNA expression of less than one third of the liver tissue samples (29 tissue donors, 31.2%) was confirmed by *CYP2B6* genotype, and non-genetic factors recorded in the medical history of the donors explained altered CYP2B6 expression in further 33 liver samples (35.5%). For the remaining 31 tissue donors (33.3%), no relevant information explained CYP2B6 mRNA expression different from the genotype-based phenotype prediction.

**Multivariate analysis of CYP2B6 activity and mRNA expression.** Multiple linear regression analysis was performed to estimate the influence of genetic (*CYP2B6* SNVs or haplotypes) and non-genetic covariates (sex, medication with CYP2B6 inducers or amoxicillin + clavulanic acid, chronic alcohol consumption) on CYP2B6 activity and on CYP2B6 mRNA expression (Table 4). Significant associations were observed between *S*-mephenytoin *N*-demethylation activity and the nucleotide substitution g.15631G > T ( $P=0.034$ ) or the CYP2B6 inducer therapy ( $P=0.005$ ). When the *CYP2B6* haplotypes were involved in the analysis, the impact of none of the haplotypes containing g.15631 T was significant (g.-82 T/15631 T/18053G/25505 T  $P=0.383$ ; g.-82 T/15631 T/18053A/25505 T  $P=0.427$ ), whereas CYP2B6 activity-reducing non-genetic factors (chronic alcohol consumption and amoxicillin + clavulanic acid therapy) appeared to be associated with CYP2B6 activity ( $P=0.050$ ). Furthermore, hepatic CYP2B6 mRNA expression was found to be significantly associated with the nucleotide substitution g.15631G > T ( $P=0.004$ ) and also with g.18053A > G ( $P=0.038$ ). Involving *CYP2B6* haplotypes in the multiple regression model, the association between CYP2B6 mRNA expression and the g.-82 T/15631 T/18053G/25505 T haplotype present in *CYP2B6*\*6 allele became significant ( $P=0.025$ ). Both the CYP2B6 inducer therapy and the expression reducing non-genetic factors displayed significant association with hepatic CYP2B6 expression ( $P<0.001$  and  $P=0.021$ , respectively). However, sex appeared to have no influence on either CYP2B6 activity or mRNA expression.

## Discussion

Genetic variability of *CYP2B6* has been reported to be associated with significant interindividual variations in pharmacokinetics of several clinically important drugs (antiretroviral, anticancer, antidepressant, antimalarial drugs)<sup>58</sup>. Moreover, preliminary pharmacogenetic testing is highly recommended for patients on efavirenz therapy for proper therapeutic efficacy and for limitation of adverse reactions<sup>23</sup>. Identification of SNVs in *CYP2B6* gene and haplotype estimation constitute a major challenge, because for *CYP2B6* genotyping, reliable and *CYP2B6*-selective assays are required that can distinguish *CYP2B6* sequences from the highly homologous pseudogene *CYP2B7P*. TaqMan PCR assays offer accurate, sensitive, cost-efficient and fast SNV-discrimination method. Validated TaqMan *CYP2B6* genotyping assays are commercially available for g.-82 T > C, g.15631G > T and g.25505C > T polymorphisms, but not for g.18053A > G, which is present in many allelic variants including *CYP2B6*\*4 and the most frequent and widely studied *CYP2B6*\*6; therefore, for identification of g.18053A > G, we have developed a novel, two-step genotyping assay. In the 119 liver samples, the frequencies of *CYP2B6* alleles and genotypes in liver tissue donors were demonstrated to be similar to those in Caucasian populations (Table 2) (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>, access date: 24.01.2022)<sup>8</sup>. Although genetic polymorphisms of *CYP2B6* can elucidate the substantial interindividual variability in CYP2B6 expression and activity to some extent, non-genetic factors can significantly modify the CYP2B6 phenotype predicted from genotype. The present study investigated the contribution of *CYP2B6* genetic and non-genetic factors to CYP2B6-selective *S*-mephenytoin *N*-demethylation and CYP2B6 mRNA expression as well as the *CYP2B6* genotype–phenotype mismatch in human liver tissues. *S*-Mephenytoin as the probe substrate and its *N*-demethylation reaction is frequently used for characterization of hepatic microsomal CYP2B6 activity<sup>59</sup>; however, only a few studies have applied this CYP2B6-selective reaction in genotype–phenotype analysis<sup>21,30,60</sup>. In CYP2B6 expression analysis, the primer pair was designed to the exons 3 and 4 for the quantification of the full-length CYP2B6 mRNA. The strong association between CYP2B6 mRNA and *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity in human liver tissues proved that the amplicon produced in the quantitative PCR was appropriate for the identification of the functional CYP2B6 mRNA and did not detect the truncated mRNA variant.

Several in vitro and in vivo studies indicated that some *CYP2B6* allelic variants may have substrate-specific effect on CYP2B6 function that further complicates the CYP2B6 phenotype estimation based on PharmVar

criteria system<sup>8,9</sup>. PharmVar classification is appropriate for *CYP2B6* genotype guided efavirenz therapy, whereas *CYP2B6* pharmacogenetics appear to have an opposite impact on cyclophosphamide bioactivation. The most common *CYP2B6*\*6 is associated with the expression of an mRNA variant lacking exons 4–6 due to aberrant splicing, and consequently with decreased hepatic activity in efavirenz and bupropion metabolism<sup>18,19,22</sup>. Efavirenz exposure has been reported to increase in patients with *CYP2B6*\*1/\*6 or *CYP2B6*\*6/\*6; therefore, substantial dose reduction has been recommended for better tolerability<sup>15,23</sup>. Although the presence of *CYP2B6*\*6 allele appeared to have minor or negligible effect on bupropion exposure, hydroxylation of both enantiomers was lower in patients carrying *CYP2B6*\*6/\*6<sup>17,61</sup>. Contradictory results have been reported on metabolic activation of the prodrug cyclophosphamide in hepatic microsomes from *CYP2B6*\*6 carriers<sup>18,62,63</sup>; however, lower 4-hydroxy-cyclophosphamide production and worse treatment response to cyclophosphamide was observed in patients with *CYP2B6*\*6 allele than in *CYP2B6*\*6 non-carriers<sup>64</sup>. The g.18053A > G nucleotide change in *CYP2B6*\*4 allelic variant has been reported to significantly alter the enzyme structure leading to a functionally different protein variant and to increased drug-metabolizing activity<sup>12,13,15–17,65</sup>. The *CYP2B6*\*4 allele contributed to increased activity in efavirenz 8-hydroxylation and to reduced plasma concentration of efavirenz in HIV-infected patients<sup>15,18</sup>; however, dose modification was not required for efficient efavirenz therapy<sup>23</sup>. Intrinsic clearance of both bupropion enantiomers was minimally increased by *CYP2B6*\*4, whereas pharmacokinetic studies demonstrated significantly high bupropion clearance in vivo and consequently high hydroxy-bupropion exposure in *CYP2B6*\*4 carrier subjects<sup>17,61,66</sup>. Interestingly, *CYP2B6*\*4 displayed lower cyclophosphamide 4-hydroxylation activity in vitro than *CYP2B6*\*1<sup>18,63</sup>; however, *CYP2B6*\*1/\*4 genotype appeared to have no impact on 4-hydroxy-cyclophosphamide formation in vivo comparing to *CYP2B6*\*1/\*1<sup>64</sup>. In the liver tissues of the present study, *CYP2B6* mRNA expression was significantly associated with the g.15631C > T and g.18053A > G SNVs and even more with the g.-82 T/15631 T/18053G/25505 T haplotype designated as *CYP2B6*\*6. *S*-Mephenytoin *N*-demethylase activity appeared to be significantly influenced by g.15631C > T, and marginally significant impact of g.18053A > G was demonstrated; however, the haplotype g.-82 T/15631 T/18053G/25505 T (*CYP2B6*\*6) did not affect *CYP2B6* activity at all.

Besides *CYP2B6* genetic variations, phenoconverting non-genetic factors, such as sex, age, co-medication and co-morbidities, have been considered to contribute to the interindividual variability in *CYP2B6* activity and expression<sup>9,29,58</sup>. Al Koudsi et al. attributed 10% of variations in *CYP2B6* protein expression to *CYP2B6* genotype, 14% to gender and 21% to exposure to hepatic CYP inducers<sup>32</sup>. Several studies indicated that females displayed significantly higher *CYP2B6* expression and activity than males<sup>30,32,67</sup>. It was explained by estradiol induction through an estrogen response element in the regulatory region of *CYP2B6* gene<sup>68,69</sup>. However, other studies, including the present work, demonstrated no association between gender and *CYP2B6* phenotypes<sup>19,31,33,34</sup>. Environmental non-genetic factors, such as *CYP2B6*-specific or non-specific medication and the consequences of chronic alcohol consumption are expected to contribute to the high interindividual variability in *CYP2B6* expression and activity. Of less than 30% of liver tissue donors, *CYP2B6* genetic variability influenced the *CYP2B6* phenotype, whereas of more than 35% of tissue donors, non-genetic factors were reported in the medical history that significantly altered *S*-mephenytoin *N*-demethylase activity and/or *CYP2B6* mRNA expression. In addition to genetic variations, the impact of both *CYP2B6*-selective inhibitors and inducers is highly recommended to be taken into account during *CYP2B6* phenotype prediction<sup>8,9,29</sup>. The function of several CYP enzymes have been demonstrated to be inhibited by 1,4-dihydropyridine calcium-channel antagonists, including amlodipine that was found to strongly inhibit in vitro activities of *CYP2B6* and *CYP3A4*; however, the clinical significance of the interaction between amlodipine and *CYP2B6* might be minor because of the relatively high IC<sub>50</sub> values towards *CYP2B6* substrates<sup>49,70</sup>. In two subjects, one with *CYP2B6*\*1/\*1, the other with *CYP2B6*\*5/\*6 genotype, and predicted to be ‘normal’ and ‘intermediate’ metabolizers, respectively, the low *S*-mephenytoin *N*-demethylation was attributed to the antihypertensive amlodipine therapy that might have transiently evoked poor *CYP2B6* activity. Furthermore, the exposure to *CYP2B6* inducers, including the antibiotics rifampicin, the corticosteroid derivative prednisolone, cortisone, hydrocortisone and dexamethasone, the benzodiazepine diazepam and midazolam, and the calcium channel blocker felodipine induces transcriptional expression of *CYP2B6* gene via nuclear receptors (PXR, CAR)<sup>25,50,52,53,55,57,71</sup>. Rifampicin treatment has been demonstrated to substantially increase the clearance of bupropion and the formation of hydroxy-bupropion metabolite<sup>72</sup>. Furthermore, selective activation of CAR has been found to lead to increased bioactivation of cyclophosphamide in hepatocytes and to enhanced cytotoxicity in leukemia cells<sup>73</sup>. Metabolic activation of cyclophosphamide is primarily catalyzed by *CYP2B6* with minor contribution of *CYP3A4*, whereas *CYP3A4* is responsible for the inactivation pathway<sup>74</sup>. Since CAR preferentially mediates transcriptional induction of *CYP2B6* over *CYP3A4*, CAR activation resulted in an increase in the active metabolite formation and in elevated antitumor activity<sup>73</sup>. In the liver tissue donors, the *CYP2B6* inducer therapy in their medical history (dexamethasone, methylprednisolone, prednisolone, hydrocortisone, cortisone, midazolam, felodipine, diazepam) was significantly associated with increased *CYP2B6* mRNA expression and activity. Particularly in those with one or two loss-of-function alleles predicted to be ‘intermediate’ or ‘poor’ metabolizers, high or high-intermediate activity and expression were observed. The loss-of-function alleles (*CYP2B6*\*6 and *CYP2B6*\*9) display some residual expression and activity; therefore, it was logically assumed that the exposure to a *CYP2B6* inducer ameliorated the reduced function of *CYP2B6* predicted from genotype. The clinical study by Lobo et al. involving healthy volunteers demonstrated that rifampicin induction increased bupropion clearance even in those carrying the loss-of-function *CYP2B6*\*6 allele<sup>72</sup>. As a consequence of rifampicin treatment (PXR activation), hydroxy-bupropion formation was enhanced in subjects with *CYP2B6*\*1/\*6 as well as in *CYP2B6*\*1/\*1 carriers<sup>72</sup>. In the liver tissue donors of the present study, increased *S*-mephenytoin *N*-demethylation activity and *CYP2B6* mRNA expression were associated with *CYP2B6* inducer therapy, and 83% of the subjects exposed to *CYP2B6* inducers (19/23) carried one or two copies of *CYP2B6*\*6 allele; however, for the clear evidence for the *CYP2B6*\*6-dependent susceptibility to induction, further study involving a large population is required. The polymorphism of g.-82 T > C has nevertheless been demonstrated to be associated with *CYP2B6*

genotype-dependent susceptibility to rifampicin induction due to increased recruitment of PXR to the promoter region in g.-82C carriers<sup>10</sup>. Genotype-dependent susceptibility to CYP2B6 inhibitors has also been reported by Talakad et al. demonstrating an increase in inhibitory constant ( $K_i$ ) values of the *CYP2B6\*4* and *CYP2B6\*6* variants with sertraline or clopidogrel compared to the wild-type enzyme<sup>75</sup>. However, *CYP2B6\*6* was found to be more susceptible to voriconazole inhibition than *CYP2B6\*1*<sup>76</sup>, indicating inhibitor-dependent susceptibility of *CYP2B6\*6*. Duration of phenoconversion and the recovery after CYP2B6 inhibition or induction have been reported to depend on the elimination rate of the inhibitor or inducer drugs and/or on enzyme turnover<sup>77</sup>. In the liver tissue donors, the putative time-course of drug-induced phenoconversion might have influenced the hepatic CYP2B6 activity and expression after discontinuation of the CYP2B6 inhibitor amlodipine or CYP2B6 inducer drugs. Considering the fact that the information on the drug therapy (both chronic and acute) applied prior the brain-death was recorded in the clinical histories, and the time of tissue explantation never exceeded 3 h, we assumed that no loss of altered enzyme activity or expression occurred in liver samples. Amlodipine and the CYP2B6 inducers are drugs with relatively long half-lives (12–60 h); furthermore, the de-induction and the recovery of CYP enzyme after inducer discontinuation has been calculated to require 3–7 days<sup>78,79</sup>; therefore, we considered that phenoconversion evoked by these drugs still existed at the time of explantation.

Furthermore, reduced CYP2B6 activity and/or expression in liver tissues was also associated with the non-specific amoxicillin + clavulanic acid therapy and/or chronic alcohol consumption. Amoxicillin, effective against a wide range of bacterial infections, is often used in combination with clavulanic acid that prevents bacterial metabolism of amoxicillin<sup>80</sup>. Moderately severe hepatotoxic side effect of this combination has been reported; severe hepatic dysfunction however rarely occurs<sup>56,81</sup>. Chronic alcohol consumption is one of the major causes of liver diseases, the progression of which is explained by several pathological processes (e.g. inflammation, oxidative stress); however, the exact pathomechanism is not clearly understood<sup>84</sup>. No information is available about CYP2B6-selective inhibition or downregulation induced by amoxicillin + clavulanic acid or chronic alcohol consumption; however, hepatotoxicity and the associated inflammatory processes were assumed to influence CYP expression and function<sup>82</sup>. Clear evidence has been provided that the release of proinflammatory cytokines during inflammation downregulates both protein or mRNA expression of several CYPs, including CYP2B6<sup>83,84</sup>. IL-6 (interleukin 6) and IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) proinflammatory cytokines have been demonstrated to downregulate the expression of CYP2B6 mRNA and protein as well as CYP2B6 activity<sup>51,85–88</sup>. In the liver tissue donors with amoxicillin + clavulanic acid therapy and/or chronic alcohol consumption, decreased CYP2B6 expression and S-mephenytoin *N*-demethylase activity were attributed to a non-specific impact of inflammatory processes on CYP function rather than to a CYP2B6-selective suppression.

The present work indicated that *CYP2B6* genetic polymorphisms influenced the expression and activity of CYP2B6 enzyme to some extent; however, the significance of phenoconverting non-genetic factors in enzyme function was comparable with that of genetic factors or even phenoconversion masked the effect of *CYP2B6* allelic variants. Ing Lorenzini et al. evaluated the predictive values of CYP genotypes on CYP-mediated drug metabolism in patients, and observed relatively good CYP2B6 genotype–phenotype concordance for poor and rapid metabolizers (67% and 100%), but more variable for intermediate and normal metabolizers (0% and 38%)<sup>89</sup>. It should be noted that the number of patients involved in the interpretation of CYP2B6 genotype–phenotype concordance was limited ( $N = 36$ ). In a retrospective study involving patients taking analgesic drugs for chronic pain, genetic variability and non-genetic factors influencing drug-metabolizing enzyme activities were associated with the occurrence of adverse drug reactions and/or non-response to the therapy in 40% and 28% of the cases<sup>90</sup>.

Some limitations of the present work should be discussed. First, we assessed the impact of *CYP2B6* alleles most common in Caucasian populations, and some other, functionally relevant allelic variants were not identified (*CYP2B6\*7* or *CYP2B6\*12*); however, their prevalence is low in Caucasian populations. Second, the medical history of some tissue donors may be assumed to be incomplete, and some information about relevant non-genetic factors was missing that might have influenced the interpretation of CYP2B6 phenotypes. Certain co-morbidities have been demonstrated to impact the function of drug-metabolizing enzymes; however, in the clinical histories of the tissue donors, the information of relevant pathological conditions was scarcely or incompletely recorded.

Although pharmacogenetic testing of drug-metabolizing CYP enzymes is an effective approach towards optimization and personalization of drug therapy<sup>23,91</sup>, the assessment of patients' drug-metabolizing capacity is far more complex than a simple prediction from the genotype. The present work has demonstrated that both CYP2B6 genetic and non-genetic variations were important to be taken into account in CYP2B6 phenotype interpretation. However, in approximately one third of the subjects, a CYP2B6 genotype–phenotype mismatch still existed. Identifying potential factors (both CYP2B6-specific and non-specific factors) in CYP2B6 phenotype variability and considering both genetic variations and non-genetic factors is a pressing requirement for appropriate elucidation of CYP2B6 genotype–phenotype mismatch that may improve prediction of pharmacokinetic variations and clinical outcome of a drug that is primarily or exclusively metabolized by CYP2B6 enzyme (e.g. cyclophosphamide, efavirenz, bupropion, ketamine, methadone).

Received: 26 November 2021; Accepted: 10 February 2022

Published online: 22 February 2022

## References

1. Turpeinen, M., Raunio, H. & Pelkonen, O. The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: Substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr. Drug Metab.* **7**, 705–714 (2006).
2. 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).

3. Achour, B., Barber, J. & Rostami-Hodjegan, A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes and their intercorrelations: A meta-analysis. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1349–1356 (2014).
4. Hedrich, W. D., Hassan, H. E. & Wang, H. Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions. *Acta Pharm. Sin. B.* **6**, 413–425 (2016).
5. Heyn, H., White, R. B. & Stevens, J. C. Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the *N*-demethylation of *S*-mephenytoin. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 948–954 (1996).
6. Faucette, S. R. *et al.* Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1222–1230 (2000).
7. Ward, B. A. *et al.* The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: Implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 287–300 (2003).
8. Zanger, U. M. & Klein, K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): Advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Genet.* **4**, 24 (2013).
9. Desta, Z. *et al.* PharmVar GeneFocus: CYP2B6. *Clin. Pharmacol. Ther.* **110**, 82–97 (2021).
10. Li, H., Ferguson, S. S. & Wang, H. Synergistically enhanced CYP2B6 inducibility between a polymorphic mutation in CYP2B6 promoter and pregnane X receptor activation. *Mol. Pharmacol.* **78**, 704–713 (2010).
11. Zukunft, J. *et al.* A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1772–1782 (2005).
12. Bumpus, N. N., Sridar, C., Kent, U. M. & Hollenberg, P. F. The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 795–802 (2005).
13. Bumpus, N. N. & Hollenberg, P. F. Investigation of the mechanisms underlying the differential effects of the K262R mutation of P450 2B6 on catalytic activity. *Mol. Pharmacol.* **74**, 990–999 (2008).
14. Wang, P. F., Neiner, A. & Kharasch, E. D. Efavirenz metabolism: Influence of polymorphic CYP2B6 variants and stereochemistry. *Drug Metab. Dispos.* **47**, 1195–1205 (2019).
15. Rotger, M. *et al.* Predictive value of known and novel alleles of CYP2B6 for efavirenz plasma concentrations in HIV-infected individuals. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 557–566 (2007).
16. Kharasch, E. D., Regina, K. J., Blood, J. & Friedel, C. Methadone pharmacogenetics: CYP2B6 polymorphisms determine plasma concentrations, clearance, and metabolism. *Anesthesiology* **123**, 1142–1153 (2015).
17. Kharasch, E. D. & Crafford, A. Common polymorphisms of CYP2B6 influence stereoselective bupropion disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.* **105**, 142–152 (2019).
18. Ariyoshi, N. *et al.* Q172H replacement overcomes effects on the metabolism of cyclophosphamide and efavirenz caused by CYP2B6 variant with Arg262. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 2045–2048 (2011).
19. Hofmann, M. H. *et al.* Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6\*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 284–292 (2008).
20. Zhang, H. *et al.* Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: A charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome P450-reductase complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 803–809 (2011).
21. Lang, T. *et al.* Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* **11**, 399–415 (2001).
22. Desta, Z. *et al.* Impact of CYP2B6 polymorphism on hepatic efavirenz metabolism in vitro. *Pharmacogenomics* **8**, 547–558 (2007).
23. Desta, Z. *et al.* Clinical pharmacogenetics Implementation consortium (CPIC) guideline for CYP2B6 and efavirenz-containing antiretroviral therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **106**, 726–733 (2019).
24. Shah, R. R. & Smith, R. L. Addressing phenoconversion: The Achilles' heel of personalized medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 222–240 (2015).
25. Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J. M., Maurel, P. & Vilarem, M. J. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: Consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1441–1450 (2000).
26. Turpeinen, M. *et al.* Selective inhibition of CYP2B6-catalyzed bupropion hydroxylation in human liver microsomes in vitro. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 626–631 (2004).
27. Richter, T. *et al.* Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 189–197 (2004).
28. Pelkonen, O. *et al.* Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. *Arch. Toxicol.* **82**, 667–715 (2008).
29. Turpeinen, M. & Zanger, U. M. Cytochrome P450 2B6: Function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metab. Drug Interact.* **27**, 185–197 (2012).
30. Lamba, V. *et al.* Hepatic CYP2B6 expression: Gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 906–922 (2003).
31. Parkinson, A., Mudra, D. R., Johnson, C., Dwyer, A. & Carroll, K. M. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 193–209 (2004).
32. Al Koudsi, N. & Tyndale, R. F. Hepatic CYP2B6 is altered by genetic, physiologic, and environmental factors but plays little role in nicotine metabolism. *Xenobiotica* **40**, 381–392 (2010).
33. Ilic, K. *et al.* The influence of sex, ethnicity, and cyp2b6 genotype on bupropion metabolism as an index of hepatic CYP2B6 activity in humans. *Drug Metab. Dispos.* **41**, 575–581 (2013).
34. Pearce, R. E. *et al.* Developmental expression of CYP2B6: A comprehensive analysis of mRNA expression, protein content and bupropion hydroxylase activity and the impact of genetic variation. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 948–958 (2016).
35. Shah, R. R. *et al.* CYP450 genotype and pharmacogenetic association studies: a critical appraisal. *Pharmacogenomics J* **17**, 259–275 (2016).
36. Shah, R. R. Pharmacogenetics and precision medicine: Is inflammation a covert threat to effective genotype-based therapy?. *Ther. Adv. Drug Saf.* **8**, 267–272 (2017).
37. Klomp, S. D., Manson, M. L., Guchelaar, H. J. & Swen, J. J. Phenoconversion of cytochrome P450 metabolism: A systematic review. *J. Clin. Med.* **9**, 1–33 (2020).
38. Fisher, C. D. *et al.* Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 2087–2094 (2009).
39. Christensen, H. & Hermann, M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front. Pharmacol.* **3**, 8 (2012).
40. van der Hoeven, T. A. & Coon, M. J. Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate cytochrome P450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **249**, 6302–6310 (1974).
41. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
42. Korbie, D. J. & Mattick, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* **3**, 1452–1456 (2008).

43. Green, M. R. & Sambrook, J. Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019**, 175–178 (2019).
44. Bliedernicht, J. K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of *CYP2B6* single-nucleotide polymorphisms. *Clin. Chem.* **53**, 24–33 (2007).
45. Jacob, R. M., Johnstone, E. C., Neville, M. J. & Walton, R. T. Identification of *CYP2B6* sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clin. Chem.* **50**, 1372–1377 (2004).
46. Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 978–989 (2001).
47. Stephens, M. & Scheet, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 449–462 (2005).
48. Dobrin, M. *et al.* Contribution of *CYP2B6* alleles in explaining extreme (S)-methadone plasma levels: A *CYP2B6* gene resequencing study. *Pharmacogenet. Genom.* **23**, 84–93 (2013).
49. Katoh, M., Nakajima, M., Shimada, N., Yamazaki, H. & Yokoi, T. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,4-dihydropyridine calcium antagonists: Prediction of in vivo drug-drug interactions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 843–852 (2000).
50. 'tHoen, P. A. C., Bijsterbosch, M. K., van Berkel, T. J. C., Vermeulen, N. P. E. & Commandeur, J. N. M. Midazolam is a phenobarbital-like cytochrome P450 inducer in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 921–927 (2001).
51. 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).
52. Parkinson, A., Leonard, N., Draper, A. & Ogilvie, B. W. On the mechanism of hepatocarcinogenesis of benzodiazepines: Evidence that diazepam and oxazepam are *CYP2B* inducers in rats, and both *CYP2B* and *CYP4A* inducers in mice. *Drug Metab. Rev.* **38**, 235–259 (2006).
53. Vrzal, R., Kubesova, K., Pavek, P. & Dvorak, Z. Benzodiazepines medazepam and midazolam are activators of pregnane X receptor and weak inducers of *CYP3A4*: Investigation in primary cultures of human hepatocytes and hepatocarcinoma cell lines. *Toxicol. Lett.* **193**, 183–188 (2010).
54. Ceni, E., Mello, T. & Galli, A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World J. Gastroenterol.* **20**, 17756–17772 (2014).
55. Skoda, J. *et al.* Diazepam promotes translocation of human constitutive androstane receptor (CAR) via direct interaction with the ligand-binding domain. *Cells* **9**, 2532 (2020).
56. deLemos, A. S. *et al.* Amoxicillin-clavulanate-induced liver injury. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 2406–2416 (2016).
57. Štěpánková, M. *et al.* Optical isomers of dihydropyridine calcium channel blockers display enantiospecific effects on the expression and enzyme activities of human xenobiotics-metabolizing cytochromes P450. *Toxicol. Lett.* **262**, 173–186 (2016).
58. Langmia, I. M. *et al.* *CYP2B6* functional variability in drug metabolism and exposure across populations: Implication for drug safety, dosing, and individualized therapy. *Front. Genet.* **12**, 692234 (2021).
59. Yuan, R., Madani, S., Wei, X. X., Reynolds, K. & Huang, S. M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 1311–1319 (2002).
60. Barber, J., Russell, M. R., Rostami-Hodjegan, A. & Achour, B. Characterization of *CYP2B6* K262R allelic variants by quantitative allele-specific proteomics using a QconCAT standard. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **178**, 112901 (2020).
61. Kirchner, J. *et al.* Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in *CYP2B6*. *Pharmacogenetics* **13**, 619–626 (2003).
62. Xie, H. J. *et al.* Role of polymorphic human *CYP2B6* in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.* **3**, 53–61 (2003).
63. Raccor, B. S. *et al.* Potential contribution of cytochrome P450 2B6 to hepatic 4-hydroxycyclophosphamide formation in vitro and in vivo. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 54–63 (2012).
64. Shu, W. *et al.* Cytochrome P450 genetic variations can predict mRNA expression, cyclophosphamide 4-hydroxylation, and treatment outcomes in Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Pharmacol.* **57**, 886–898 (2017).
65. Shebley, M. & Hollenberg, P. F. Mutation of a single residue (K262R) in P450 2B6 leads to loss of mechanism-based inactivation by phencyclidine. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1365–1371 (2007).
66. Wang, P. F., Neiner, A. & Kharasch, E. D. Stereoselective bupropion hydroxylation by cytochrome P450 *CYP2B6* and cytochrome P450 oxidoreductase genetic variants. *Drug Metab. Dispos.* **48**, 438–445 (2020).
67. Choong, E. *et al.* Sex difference in formation of propofol metabolites: A replication study. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **113**, 126–131 (2013).
68. Dickmann, L. J. & Isoherranen, N. Quantitative prediction of *CYP2B6* induction by estradiol during pregnancy: Potential explanation for increased methadone clearance during pregnancy. *Drug Metab. Dispos.* **41**, 270–274 (2013).
69. Chiang, Y. C. *et al.* Reduced dosing and liability in methadone maintenance treatment by targeting oestrogen signal for morphine addiction. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3552–3564 (2017).
70. Krasulova, K., Holas, O. & Anzenbacher, P. Influence of amlodipine enantiomers on human microsomal cytochromes P450: Stereoselective time-dependent inhibition of *CYP3A* enzyme activity. *Molecules* **22**, 1879 (2017).
71. Monostory, K. & Dvorak, Z. Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Curr. Drug Metab.* **12**, 154–172 (2011).
72. Lobo, K. K. *et al.* Cytochrome P450 2B6 activity as measured by bupropion hydroxylation: Effect of induction by rifampin and ethnicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 75–84 (2006).
73. Wang, D. *et al.* The constitutive androstane receptor is a novel therapeutic target facilitating cyclophosphamide-based treatment of hematopoietic malignancies. *Blood* **121**, 329–338 (2013).
74. Huang, Z., Roy, P. & Waxman, D. J. Role of human liver microsomal *CYP3A4* and *CYP2B6* in catalyzing *N*-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 961–972 (2000).
75. Talakad, J. C., Kumary, S. & Halpern, J. R. Decreased susceptibility of the cytochrome P450 2B6 variant K262R to inhibition by several clinically important drugs. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 644–650 (2009).
76. Xu, C., Ogburn, E. T., Guo, Y. & Desta, Z. Effects of the *CYP2B6*\*6 allele on catalytic properties and inhibition of *CYP2B6* in vitro: Implication for the mechanism of reduced Efavirenz metabolism and other *CYP2B6* substrates in vivo. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 717–725 (2012).
77. Imai, H., Kotegawa, T. & Ohashi, K. Duration of drug interactions: Putative time courses after mechanism-based inhibition or induction of CYPs. *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* **4**, 409–411 (2011).
78. Imai, H. *et al.* The recovery time-course of *CYP3A* after induction by St John's wort administration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 701–707 (2008).
79. Depierre, J. W. & Ernster, L. Disappearance of induced endoplasmic reticulum after cessation of phenobarbital treatment. *FEBS Lett.* **68**, 219–224 (1976).
80. Navarro, A. S. New formulations of amoxicillin/clavulanic acid: A pharmacokinetic and pharmacodynamic review. *Clin. Pharmacokinet.* **44**, 1097–1115 (2005).
81. Gresser, U. Amoxicillin-clavulanic acid therapy may be associated with severe side effects: Review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* **6**, 139–149 (2001).
82. Chan, L. N. & Anderson, G. D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with ethanol (Alcohol). *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 1115–1136 (2014).
83. Aitken, A. E., Richardson, T. A. & Morgan, E. T. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 123–149 (2006).

84. Shah, R. R. & Smith, R. L. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: Hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 400–410 (2015).
85. 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).
86. Klein, M. *et al.* A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on ADME gene expression and activity in primary human hepatocytes and HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 273–283 (2015).
87. Ning, R. *et al.* Interleukin-6 induces DEC1, promotes DEC1 interaction with RXRa and suppresses the expression of PXR, CAR and their target genes. *Front. Pharmacol.* **8**, 866 (2017).
88. Tanner, N. *et al.* Regulation of drug metabolism by the interplay of inflammatory signaling, steatosis, and xeno-sensing receptors in HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **46**, 326–335 (2018).
89. Ing Lorenzini, K. *et al.* CYP450 genotype: Phenotype concordance using the Geneva micrococktail in a clinical setting. *Front. Pharmacol.* **12**, 730637 (2021).
90. Rollason, V. *et al.* Evaluation of phenotypic and genotypic variations of drug metabolising enzymes and transporters in chronic pain patients facing adverse drug reactions or non-response to analgesics: A retrospective study. *J. Pers. Med.* **10**, 198 (2020).
91. Storelli, F., Samer, C., Reny, J. L., Desmeules, J. & Daali, Y. Complex drug–drug–gene–disease interactions involving cytochromes P450: Systematic review of published case reports and clinical perspectives. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 1267–1293 (2018).

## Acknowledgements

The authors are indebted to János Fekete for his valuable advice in statistical analysis. This work was supported by the grant of VEEKOP-2.3.3-15-2017-00014. Project no. 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00021 has been implemented with the support provided by the Ministry of Innovation and Technology of Hungary from the National Research, Development and Innovation Fund, financed under the 2020.1.1.2-PIACI-KFI funding scheme.

## Author contributions

Study conception and design: K.M., K.M.; C.Y.P. genotyping, measurement of enzyme activity and expression: K.M., Á.F.K., F.F., R.E.; data analysis and interpretation: K.M., K.M.; manuscript drafting: K.M., K.M. All authors reviewed the manuscript and approved the final version.

## Funding

Open access funding provided by ELKH Research Centre for Natural Sciences.

## 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/s41598-022-07022-9>.

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

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://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) 2022



OPEN

## Association between *CYP2B6* genetic variability and cyclophosphamide therapy in pediatric patients with neuroblastoma

Katalin Mangó<sup>1,2</sup>, Ferenc Fekete<sup>1</sup>, Ádám Ferenc Kiss<sup>1</sup>, Réka Erdős<sup>1</sup>, János Tibor Fekete<sup>1,5</sup>, Tamás Búdi<sup>3</sup>, Edit Bruckner<sup>3</sup>, Miklós Garami<sup>3</sup>, Tamás Micsik<sup>4</sup> & Katalin Monostory<sup>1</sup>✉

Cyclophosphamide, an oxazaphosphorine prodrug is frequently used in treatment of neuroblastoma, which is one of the most prevalent solid organ malignancies in infants and young children. Cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*) is the major catalyst and *CYP2C19* is the minor enzyme in bioactivation and inactivation pathways of cyclophosphamide. CYP-mediated metabolism may contribute to the variable pharmacokinetics of cyclophosphamide and its toxic byproducts leading to insufficient response to the therapy and development of clinically significant side effects. The aim of the study was to reveal the contribution of pharmacogenetic variability in *CYP2B6* and *CYP2C19* to the treatment efficacy and cyclophosphamide-induced side effects in pediatric neuroblastoma patients under cyclophosphamide therapy (N = 50). Cyclophosphamide-induced hematologic toxicities were pivotal in all patients, whereas only moderate hepatorenal toxicity was developed. The patients' *CYP2B6* metabolizer phenotypes were associated with the occurrence of lymphopenia, thrombocytopenia, and monocytopenia as well as of liver injury, but not with kidney or urinary bladder (hemorrhagic cystitis) toxicities. Furthermore, the patients' age (<1.5 years, P = 0.03) and female gender (P ≤ 0.02), but not *CYP2B6* or *CYP2C19* metabolizer phenotypes appeared as significant prognostic factors in treatment outcomes. Our results may contribute to a better understanding of the impact of *CYP2B6* variability on cyclophosphamide-induced side effects.

### Abbreviations

ALDH	Aldehyde dehydrogenase
ALT	Alanine aminotransferase
CPIC	Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium
GGT	Gamma-glutamyltransferase
CTC	Common toxicity criteria
CYP	Cytochrome P450
INRC	International Neuroblastoma Response Criteria
INSS	International Neuroblastoma Staging System
PharmVar	Pharmacogene Variation Consortium
MYCN	V-Myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
SNV	Single nucleotide variation

Neuroblastoma is one of the most prevalent solid organ malignancies in infants and young children, mainly under 5 years of age (6% of all childhood cancers), and its incidence rates vary between 3 and 15 per million children<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Magyar Tudósok 2, 1117 Budapest, Hungary. <sup>2</sup>Doctoral School of Pharmaceutical Sciences, Semmelweis University, Üllői 26, 1085 Budapest, Hungary. <sup>3</sup>Center of Pediatrics, Semmelweis University, Tűzoltó 7-9, 1094 Budapest, Hungary. <sup>4</sup>Fejér County Saint George University Teaching Hospital, Seregélyesi 3, 8000 Székesfehérvár, Hungary. <sup>5</sup>Department of Bioinformatics, Semmelweis University, Tűzoltó 7-9, 1094 Budapest, Hungary. ✉email: monostory.katalin@ttk.hu



It develops from neural crest cell precursors and forms the primary tumour in the adrenal medulla or along the sympathetic nervous chain. The risk-stratified treatment approach is based on the outstanding heterogeneity of the disease regarding the clinical characteristics or the biological and histological features of the tumours<sup>3</sup>. The therapy for patients diagnosed with low-to-intermediate-risk neuroblastomas ranges from observation alone to surgical resection of the tumour with or without moderate multiagent chemotherapy, and it is predicted to result in favourable outcome with 90–95% survival rates<sup>4</sup>. The treatment of patients with high-risk neuroblastomas is strictly defined by standard regimens, including induction chemotherapy, surgical resection, consolidation and maintenance therapy. However, the long-term survival rate of these patients is only 40–50% despite complex multimodal therapy<sup>5,6</sup>. Multiagent conventional chemotherapy is pivotal in the treatment of neuroblastoma, and cyclophosphamide is one of the most frequently used agents<sup>3,6</sup>.

Cyclophosphamide is an oxazaphosphorine prodrug, and metabolic activation is required for the formation of the cytotoxic nitrogen mustard. Phosphoramidate mustard is an alkylating agent that creates covalent linkages, intra- and interstrand DNA crosslinks between intracellular nucleophiles, resulting in cell death<sup>7,8</sup>. Biotransformation of cyclophosphamide is catalysed by hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes, which are crucial for the bioactivation and formation of the active metabolite as well as in the inactivation of cyclophosphamide. Approximately 70–80% of the administered dose is metabolized to 4-hydroxycyclophosphamide primarily by CYP2B6 and to a minor extent by CYP2C19 and CYP3A4 enzymes, whereas only 10% of cyclophosphamide is inactivated via *N*-dechloroethylation by CYP3A4. The 4-hydroxy metabolite and its tautomer isoform, aldophosphamide are considered to be the transport form of the nitrogen mustard<sup>9–11</sup>. Chemical decomposition of aldophosphamide leads to the formation of the active metabolite, phosphoramidate mustard, and the toxic byproduct, acrolein, while aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) converts aldophosphamide to the inactive excretory metabolite, carboxyphosphamide<sup>12,13</sup>. A sufficient response to cyclophosphamide treatment has been assumed in tumour cells with low ALDH activity, whereas high ALDH expression is thought to be associated with cyclophosphamide resistance<sup>14,15</sup>. The cytotoxicity of phosphoramidate mustard, as a side effect of cyclophosphamide treatment, is primarily manifested in sensitive normal cell populations with low ALDH1A1 expression, especially in hematopoietic progenitor cells. Suppression of hematopoietic cell generation leading to leukopenia is relatively common after cyclophosphamide treatment<sup>16,17</sup>. Although CYP-mediated metabolic pathways also produce chemotherapeutically inactive metabolites, acrolein and chloroacetaldehyde are responsible for clinically significant side effects. Bladder toxicity causing hemorrhagic cystitis is one of the most common side effects associated with highly reactive, unsaturated aldehyde acrolein excreted in the urine. Cyclophosphamide-induced hepatotoxicity has been reported to occur rarely and mainly with high-dose therapy; however, it is also associated with the formation of acrolein<sup>18–20</sup>. Oxidative stress evoked by acrolein is efficiently prevented by the co-administration of mesna (2-mercaptoethane sulfonate) which interacts with acrolein to produce a non-toxic adduct<sup>21,22</sup>. The minor inactivation pathway of cyclophosphamide leads to the cleavage of the chloroacetaldehyde metabolite which has been reported to be responsible for neuro-, cardio- and nephrotoxicity<sup>10,23,24</sup>. A recent study has also demonstrated that the urotoxicity of chloroacetaldehyde contributes to urothelial dysfunction<sup>25</sup>.

Substantial variability in cyclophosphamide pharmacokinetics has been reported in patients, and the variation in the exposure to active and inactive metabolites may lead to differences in patients' response to cyclophosphamide and in the development of adverse reactions<sup>19,20,26–29</sup>. The outcomes of cyclophosphamide therapy are well documented in adult patients<sup>30</sup>; however, only a few studies have focused on pediatric malignancies<sup>20,31–35</sup>. Cyclophosphamide clearance is more intense in children than in adults; furthermore, children display age-dependent response to cyclophosphamide requiring modification of dosing protocol from the very early to late childhood<sup>27,34,35</sup>. One of the most notable sources of interindividual variability in response to cyclophosphamide is drug metabolism, highlighting the outstanding role of CYP2B6 enzyme in both the bioactivation and inactivation pathways<sup>30</sup>. CYP2B6 function is primarily influenced by genetic polymorphisms, whereas non-genetic factors (e.g., medication, nutrition, age, disease) can transiently modify the expression and/or the activity of CYP2B6 enzyme<sup>36–38</sup> (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2B6>, access date: 26.04.2023). In the last two decades, the impact of *CYP2B6* genetic variants was investigated on pharmacokinetics and therapeutic outcomes of several *CYP2B6*-substrate drugs, including efavirenz, bupropion, methadone, *S*-mephenytoin and cyclophosphamide<sup>30,39–41</sup>. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for efavirenz dosing has recently been published for patients with various *CYP2B6* metabolizer phenotypes (poor, intermediate, normal and rapid/ultra-rapid metabolizers) predicted from their *CYP2B6* genotypes<sup>42</sup>. *CYP2B6*\*6, one of the most prevalent allelic variants (carrying both g.18053A>G [rs2279343] and g.15631G>T [rs3745274]) is associated with decreased mRNA expression and enzyme activity, designating 'poor' or 'intermediate' metabolizer phenotypes. Lower clearance of efavirenz or cyclophosphamide has been reported in patients who carry *CYP2B6*\*6 than in non-carriers<sup>35,42–44</sup>. *CYP2B6*\*9 variant (g.15631G>T [rs3745274]) is associated with decreased bupropion and efavirenz hydroxylation assuming 'poor' or 'intermediate' metabolizer phenotypes similarly to *CYP2B6*\*6; however, the clinical importance of *CYP2B6*\*9 can be hardly interpreted because of the low prevalence in all populations<sup>45,46</sup>. *CYP2B6*\*4 allele (carrying g.18053A>G [rs2279343]) creates a structurally altered enzyme variant which is associated with enhanced *CYP2B6* catalytic activity, predicting 'rapid/ultra-rapid' metabolizer phenotype<sup>42,47</sup>. *CYP2B6*\*5 allele (g.25505C>T [rs3211371]) has been suggested to have a mild or negligible effect on *CYP2B6* catalytic activity, and it is associated with 'normal' metabolizer phenotype<sup>40,42,48</sup>. The g.-82T>C (rs34223104) single nucleotide variation (SNV) in *CYP2B6*\*22 allele appears to enhance the transcription of *CYP2B6* gene leading to increased mRNA expression and catalytic activity, and carriers of *CYP2B6*\*22 are categorized as 'rapid/ultra-rapid' metabolizers<sup>42,49–51</sup>. Several *CYP2B6* alleles have been clearly demonstrated to result in decreased or increased *CYP2B6* activity; however, the association between *CYP2B6* genetic polymorphisms and cyclophosphamide pharmacokinetics or clinical outcomes of cyclophosphamide therapy is often controversial<sup>34,44,52–57</sup>. The *CYP2B6* genotype–phenotype mismatch is partly explained by non-genetic factors, such as co-medications, sex and age, which can mask the effect of *CYP2B6* allelic variants. Multidrug therapy

with CYP2B6 inducers (e.g., steroids) or inhibitors (e.g., thiotepa, amlodipine, ticlopidine) is a potential source of CYP2B6 phenoconversion that can transiently alter the biotransformation rates of CYP2B6 substrates<sup>34,37,38,56,58</sup>. It has been reported that cyclic dosage of cyclophosphamide appears to induce its own metabolism by increasing CYP2B6 protein expression in a concentration-dependent manner<sup>10,59</sup>.

Although the association of CYP pharmacogenetics with cyclophosphamide pharmacokinetics and cyclophosphamide-related toxic events has been studied in patients with several cancer types (e.g., breast cancer, chronic lymphoid leukaemia, non-Hodgkin's lymphoma)<sup>30,41,43,44</sup>, it has been scarcely investigated in patients with neuroblastoma<sup>28,29,35</sup>. The major aim of the present study was to determine the role of *CYP2B6* pharmacogenetic variability and patient-specific phenoconverting factors, such as age and sex, in the development of toxic events in pediatric patients with neuroblastoma undergoing cyclophosphamide therapy. A further aim was to find any association between the therapeutic outcome and drug-metabolizing capacity of CYP2B6, the major and CYP2C19, the minor catalysts of cyclophosphamide metabolism. Our results may contribute to a better understanding of the impact of CYP variability on the clinical manifestations of cyclophosphamide treatment in children.

## Materials and methods

**Patients and data collection.** Pediatric patients (N=50) treated with neuroblastoma at the Center of Pediatrics, Semmelweis University (Budapest) were enrolled in the present retrospective study. The inclusion criteria were written informed consent from the patients' legal representatives (generally from their parents), patients less than 18 years of age, and cyclophosphamide therapy through at least three cycles. The study was approved by the Hungarian Committee of Science and Ethics, Medical Research Council, and was conducted according to the regulations of Act CLIV of 1997 on Health and Decree 23/2002 of the Minister of Health of Hungary, and in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients belonged to the Caucasian population, and their demographic and clinical data were recorded (Table 1). The patients were designated as low-risk or high-risk subjects using International Neuroblastoma Staging System (INSS). High-risk neuroblastoma defined as (#1) Stage M neuroblastoma (distant metastatic tumours except for Ms) above 365 days of age at diagnosis (no upper age limit) and Ms neuroblastoma (metastases confined to the skin, liver and/or bone marrow) 12–18 months old, any *MYCN* status or (#2) L2 (locoregional tumour with the presence of one or more image-defined risk factors), M or Ms neuroblastoma any age, with *MYCN* amplification, or focal high level *MYC* or *MYCL* amplification. The expression of the cellular oncogene *MYCN* is high in developing tissues that normally give rise to neuroblastoma, whereas the amplification of *MYC* and *MYCL* is uncommon in neuroblastoma<sup>60,61</sup>. Cyclophosphamide dosing was calculated from the patients' body surface (bodyweight and height) according to the principles of standard regimen protocols considering pretreatment risk stratification<sup>62</sup> (Table 1). Relevant clinical, *CYP2B6* and *CYP2C19* genotype data of neuroblastoma patients were summarized in Supplementary Table 1.

**Therapeutic outcome and treatment-related toxicity.** The patients' response to therapy (responders: complete remission and partial remission; non-responders: stable disease and progressive disease/exit) was

Parameter	
Number of patients	50
Age at diagnosis (years) <sup>a</sup>	2.32 (0.10; 15.8)
< 1.5	16
> 1.5	34
Sex (female/male)	21/29
Bodyweight (kg) <sup>a</sup>	12.35 (0.59; 53.6)
Risk stratification of patients	
Low-risk	15
High-risk	35
Cyclophosphamide dose (mg/kg/day)	
Rapid COJEC <sup>b</sup>	10.5–25.5
Infant CO or CADO <sup>b</sup>	0.8–2
CADO <sup>b</sup> (≥ 1.5 years old)	2.2–2.6
Therapeutic outcome: responders	
Complete remission (CR)	16
Partial remission (PR)	8
Therapeutic outcome: non-responders	
Stable disease (SD)	9
Progressive disease/exit (PD-Exit)	17

**Table 1.** Demographic and clinical data of patients. <sup>a</sup>median (min; max); <sup>b</sup>COJEC cisplatin-vincristine-carboplatin-etoposide-cyclophosphamide, CO cyclophosphamide-vincristine, CADO cyclophosphamide-adriamycin-vincristine.

defined according to the principles of the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC)<sup>63</sup>. Hepatic, renal and hematologic toxicities were characterized by increased levels of serum alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), creatinine, sodium and potassium, and by decreased counts of leukocytes, platelets, neutrophil granulocytes, monocytes, eosinophil granulocytes and red blood cells as well as by blood in urine. These parameters were recorded a day before and at the peak or nadir (generally 7–15 days) after the cyclophosphamide treatments. Grades of renal, hepatic and bone marrow toxicities were evaluated according to the principles of National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (CTC) version 2.0 document (Supplementary Table 2). A treatment-related increase or decrease in serum parameters and cell counts was considered when the patients' parameters exceeded the upper limit or were below the lower limit in the normal reference populations at the same age.

**CYP genotyping.** Blood samples of patients (N = 50) were used to determine *CYP2B6* single nucleotide variations (SNVs) [g.18053A>G (rs2279343), g.15631G>T (rs3745274), g.25505C>T (rs3211371) and g.-82T>C (rs34223104)] and *CYP2C19* SNVs [g.19154G>A (rs4244285), g.17948G>A (rs4986893), g.1A>G (rs28399504) and g.-806C>T (rs12248560)]. Genomic DNA templates were isolated from blood samples using Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, CA). *CYP2B6* SNVs (g.15631G>T, g.25505C>T and g.-82T>C) were identified using TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assays (C\_7817765\_60, C\_30634242\_40, C\_27830964\_10, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions. For the analysis of g.18053A>G SNV, a two-step PCR assay based on the 'nested' PCR method with 'touchdown' thermal cycling protocol and TaqMan PCR was carried out<sup>38</sup>. PHASE software v2.1.1 analysis was performed from SNV data for reconstruction of *CYP2B6* haplotypes<sup>64,65</sup>. *CYP2C19* SNVs and haplotypes were determined by TaqMan allele-discrimination using primers and probes for g.19154G>A, g.17948G>A, g.1A>G and g.-806C>T as previously described by Kiss et al.<sup>66</sup>. According to the CPIC guideline regarding the functional impact of *CYP2B6* polymorphisms and *CYP2C19* diplotype to phenotype translation by PharmVar (Pharmacogene Variation Consortium), patients were classified as poor, intermediate, normal and rapid/ultrarapid metabolizers<sup>42</sup> (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>, access date: 26.04.2023).

**Data analysis.** Demographic and clinical data of 50 neuroblastoma patients were collected to evaluate the association between *CYP2B6* and *CYP2C19* genetic polymorphisms and the outcome or adverse effects of cyclophosphamide treatment using InStat v3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Binary logistic regression models were applied to evaluate the association between adverse effects or patients' response to cyclophosphamide therapy as dependent variables and *CYP2B6* SNVs, haplotypes, sex and age (age categories: < 1.5 or > 1.5 years) as co-variables. Multivariate binary logistic regression analyses were performed using IBM SPSS Statistics software [v28.0.1.0 (142), IBM Corp., Armonk, NY]. In general, P value < 0.05 was considered to be statistically significant. No formal sample size estimation applied, although for logistic regression models, the general rule of including at least 10 observations/predictor variables was applied as sample size estimation<sup>67</sup>. Posterior power calculation was performed using G\*Power 3.1.9.7 software (Christian Albrechts University, Kiel, Germany)<sup>68</sup>. Goodness of fit of logistic regression models was approved by Hosmer–Lemeshow test; furthermore, Akaike's Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC) numbers were added to each model.

**Informed consent.** Written informed consent was obtained from the patients' legal representatives.

## Results

***CYP2B6* and *CYP2C19* genetic variability in neuroblastoma patients.** Clinically relevant *CYP2B6* [g.18053A>G (rs2279343), g.15631G>T (rs3745274), g.25505C>T (rs3211371) and g.-82T>C (rs34223104)] and *CYP2C19* SNVs [g.19154G>A (rs4244285), g.17948G>A (rs4986893), g.1A>G (rs28399504), g.-806C>T (rs12248560)] most frequent in Caucasian populations were identified in pediatric patients with neuroblastoma (N = 50) (Table 2). Patients who did not carry any of the *CYP2B6* or *CYP2C19* polymorphisms were considered to have wild-type *CYP2B6*\*1 and *CYP2C19*\*1 alleles. The prevalence of *CYP2B6*\*6 and *CYP2B6*\*5 alleles was relatively high in patients (22.0% and 11.0%, respectively), whereas *CYP2B6*\*4 and *CYP2B6*\*22 alleles occurred sporadically (5.0% and 1.0%, respectively), and no patient with *CYP2B6*\*9 allele was identified. For *CYP2C19*, the most common allelic variants were *CYP2C19*\*2 and *CYP2C19*\*17 with a prevalence of 15.3% and 20.4%, respectively, whereas *CYP2C19*\*3 and *CYP2C19*\*4 did not occur in the children in the present study. The relative frequencies of the *CYP2B6* and *CYP2C19* alleles in neuroblastoma patients were similar to those previously published in Caucasian populations (Table 2)<sup>36,46,69</sup> (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>, access date: 26.04.2023; <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>).

*CYP2B6* functions and phenotypes were estimated on the basis of *CYP2B6* genotypes according to Desta et al. and PharmVar<sup>42</sup> (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>). More than one third of the patients (N = 20/50) were predicted to be poor/intermediate *CYP2B6* metabolizers, whereas the majority of the patients (N = 30/50) were found to be normal/rapid *CYP2B6* metabolizers. For the estimation of *CYP2C19* phenotypes, the recommendations of PharmVar were followed (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>). Poor/intermediate *CYP2C19* metabolizers (N = 12/49) carried at least one copy of *CYP2C19*\*2 allele. The patients with *CYP2C19*\*1/\*1 genotype were considered to be normal *CYP2C19* metabolizers (N = 22/49), whereas those carrying *CYP2C19*\*1/\*17 or *CYP2C19*\*17/\*17 genotypes belonged to the rapid/ultrarapid *CYP2C19* metabolizer category (N = 15/49).

	N <sup>a</sup>	Frequency (%)	
		Neuroblastoma patients	Caucasian population <sup>b</sup>
CYP genotype based phenotype estimation			
CYP2B6 alleles			
*4	5	5.0	2.2–6.2
*5	11	11.0	9–12.2
*6	22	22.0	7–28.1
*9	0	0	0–4.4
*22	1	1.0	1.4–2.4
Poor/intermediate CYP2B6 metabolizer (N = 20)			
CYP2B6 genotypes			
*1/*6	14	28.0	22.1–22.9
*6/*6	2	4.0	5.4–7.3
*5/*6	2	4.0	5.3–7.3
*4/*6	2	4.0	<2.1
Normal/rapid CYP2B6 metabolizer (N = 30)			
*1/*1	17	34.0	21–24.1
*1/*5	9	18.0	7.3–11.3
*1/*4	3	6.0	1–4
*1/*22	1	2.0	1.3–2.1
CYP2C19 alleles <sup>c</sup>			
*2	15	15.3	6.0–15.0
*3	0	0	<1
*4	0	0	<1
*17	20	20.4	21.5–25.0
Poor/intermediate CYP2C19 metabolizer (N = 12)			
CYP2C19 genotypes <sup>c</sup>			
*1/*2	6	12.2	18.3–18.5
*2/*2	3	6.1	2.1
*2/*17	3	6.1	6.3
Normal CYP2C19 metabolizer (N = 23)			
*1/*1	23	46.9	39.0–40.5
Rapid/ultrarapid CYP2C19 metabolizer (N = 14)			
*1/*17	11	22.4	26.9–27.5
*17/*17	3	6.1	4.6–4.7

**Table 2.** CYP2B6 and CYP2C19 allele and genotype frequencies, and genotype based phenotypes of neuroblastoma patients (N = 50). <sup>a</sup>number of alleles or number of patients. <sup>b</sup>Based on PharmVar (<https://www.pharmgkb.org/page/cyp2b6RefMaterials>, <https://www.pharmgkb.org/page/cyp2c19RefMaterials>), Zanger<sup>36</sup>, Ionova<sup>69</sup>, Zhou<sup>46</sup>. <sup>c</sup>Missing CYP2C19 data for 1 patient.

**Patients' CYP2B6 genotype and cyclophosphamide-induced hepatorenal and bladder toxicity.** The symptoms of hepatic, renal and bladder toxicity were followed in neuroblastoma patients during at least three cycles of 'low' (1–2.6 mg/kg/day) or 'intermediate' (10.5–38 mg/kg/day) doses of cyclophosphamide<sup>17</sup>. Toxicities were graded according to the Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute (CTC version 2.0; Supplementary Table 2). Elevated serum ALT and GGT levels indicated mild (grade 1 or grade 2) hepatic injury in more than half of the patients (27/49), whereas moderate (grade 3) toxicity was observed in 2 patients (2/49). Cyclophosphamide-induced bladder injury was evaluated on the basis of bloody urine symptoms, while renal toxicity was estimated by an increase in serum creatinine, sodium and potassium levels. A mild increase in serum creatinine concentrations (grade 1) indicating renal toxicity was observed in only two patients (2/49), whereas elevated sodium and/or potassium concentrations developed in 28.6% of the children (14/49). Bladder injury occurred sporadically (3/49) and was reported immediately in the first and second cycles of therapy, whereas in subsequent cycles, bloody urine symptoms were not observed.

CYP2B6 function has been supposed to be related to the development of cyclophosphamide-induced side effects; therefore, the association of patients' CYP2B6 genotype-based phenotypes with hepatic, renal and bladder toxicity was evaluated (Table 3). In 26.3% of poor/intermediate CYP2B6 metabolizers (5/19), serum ALT levels exceeded the upper limit of normal reference population, while more than half of the patients with normal/rapid CYP2B6 metabolizer phenotypes displayed elevated serum ALT levels (60.0%, 18/30). This means that CYP2B6 phenotype significantly contributed to the development of hepatic injury, as indicated by ALT increase (OR 0.238; 95% CI 0.068–0.835; N = 49, P = 0.03) (Table 3). Multivariate binary logistic regression analysis with CYP2B6 SNVs, haplotypes or genotype-based phenotypes and non-genetic factors, including age and sex as independent

	Poor/Intermediate CYP2B6 metabolizers <sup>a</sup>	Normal/Rapid CYP2B6 metabolizers <sup>a</sup>	P value
Hepatotoxicity			
ALT	26.3% (5/19)	60.0% (18/30)	<b>0.03</b>
GGT	21.0% (4/19)	40.0% (12/30)	0.21
Renal toxicity			
Creatinine	0.0% (0/19)	6.6% (2/30)	0.51
Sodium	5.2% (1/19)	6.6% (2/30)	1.00
Potassium	26.3% (5/19)	26.6% (8/30)	1.00
Bloody urine	0.0% (0/19)	10% (3/30)	0.27

**Table 3.** The incidence of symptoms indicating hepatic, renal and bladder toxicity in neuroblastoma patients with poor/intermediate and normal/rapid CYP2B6 metabolizer phenotypes. Significant values are in bold.

<sup>a</sup>Patients' CYP2B6 phenotypes were predicted on the basis of their CYP2B6 genotypes.

variables, identified that the incidence of abnormal serum ALT concentrations was significantly lower in poor/intermediate metabolizers than in normal/rapid metabolizers ( $P = 0.02$ ) most probably due to CYP2B6\*6 (g.-82T/15631T/18053G/25505T) allele ( $P = 0.008$ ). However, CYP2B6 SNVs and non-genetic factors (sex, age) had no influence on ALT increase (Table 4). Furthermore, no significant association was observed between CYP2B6 function and abnormal serum GGT levels induced by the therapy (poor/intermediate CYP2B6 metabolizers 21.0% vs normal/rapid CYP2B6 metabolizers 40.0%, OR 0.400; 95% CI 0.106–1.502;  $P = 0.21$ ) (Table 3). Blood in urine, the symptoms of bladder injury, and increased serum creatinine concentrations indicating renal toxicity rarely occurred in patients (3/49 and 2/49, respectively) (Table 3), and these patients were predicted to have normal CYP2B6 metabolizer phenotype (CYP2B6\*1/\*1, CYP2B6\*1/\*5). The incidence of abnormal serum sodium and potassium levels in poor/intermediate CYP2B6 metabolizers was equal to those in normal/rapid CYP2B6 metabolizer subjects (sodium: 5.2% vs 6.6%; OR 0.778; 95% CI 0.0656–9.223;  $P = 1.00$ ; potassium: 26.3% vs 26.6%, OR 0.982; 95% CI 0.667–3.615;  $P = 1.00$ ) (Table 3).

In conclusion, mild hepatotoxicity was observed in patients with neuroblastoma receiving cyclophosphamide therapy, which was more frequent in patients with normal/rapid CYP2B6 metabolizing capacity than in those with poor/intermediate CYP2B6 phenotypes. CYP2B6\*6 (g.-82T/15631T/18053G/25505T) haplotype seemed to significantly contribute to the decrease of the incidence of abnormal ALT levels during cyclophosphamide therapy. Remarkable kidney and bladder injury was not induced, and no association between CYP2B6 function and the development of renal and bladder toxicity was found in the patients.

Model	Variables	Increased serum ALT levels		
		Coefficient B (SE)	Exp B	P
SNVs, non-genetic factors <sup>a</sup>	Constant	- 24.39 (40,192)	0	1
	g.-82T>C (rs34223104)	22.33 (40,192)	4,996,498,070	1
	g.15631G>T (rs3745274)	0.27 (1.37)	1.31	0.84
Model 1	g.18053A>G (rs2279343)	1 (1.39)	0.14	0.16
	g.25505C>T (rs3211371)	- 1.39 (0.89)	0.24	0.11
	Sex	- 0.47 (0.70)	0.95	0.94
	Age	0.02 (0.10)	1.02	0.80
Haplotypes, non-genetic factors <sup>b,d</sup>	Constant	25.60 (79,461)	1.31E+11	1
	CYP2B6*4 (g.-82T/15631G/18053G/25505C)	- 0.69 (1.09)	0.49	0.76
	CYP2B6*5 (g.-82T/15631G/18053A/25505T)	- 1.22 (0.86)	0.29	0.16
Model 2 (corrected $P \leq 0.01$ )	CYP2B6*6 (g.-82T/15631T/18053G/25505T)	- 1.97 (0.74)	0.13	<b>0.008</b>
	CYP2B6*22 (g.-82C/15631G/18053A/25505C)	- 23.31 (79,461)	7.49E-11	1.00
	Sex	0.21 (0.70)	1.23	0.76
	Age	0.64 (0.71)	1.89	0.37
Estimated phenotype, non-genetic factors <sup>c</sup>	Constant	0.60 (0.75)	1.83	0.42
	Poor/intermediate	- 1.56 (0.67)	0.21	<b>0.02</b>
Model 3 (corrected $P \leq 0.02$ )	Sex	0.11 (0.65)	1.12	0.86
	Age	0.60 (0.68)	1.82	0.38

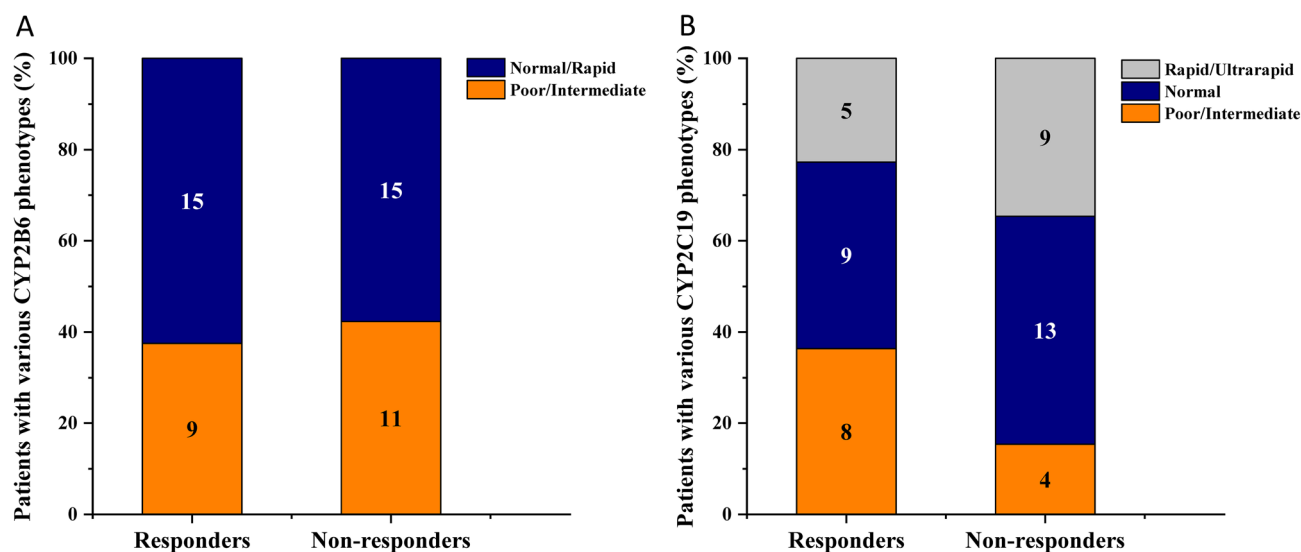
**Table 4.** Multivariate logistic regression analysis on the incidence of abnormal serum ALT level considering CYP2B6 SNVs, haplotypes, estimated phenotypes and non-genetic factors (age, sex). Significant values are in bold. <sup>a</sup>AIC: 37.71, BIC: 50.66 for model 1, <sup>b</sup>AIC: 40.89, BIC: 53.85 for model 2, <sup>c</sup>AIC: 25.59, BIC: 32.99 for model 3; <sup>d</sup>Post-hoc power: 94.1%.

**Patients' CYP2B6 genotype and the chemotherapy-induced myelosuppression.** The most common side effect of cyclophosphamide, as of many other chemotherapeutic agents, is bone marrow suppression; therefore, the association of CYP2B6 polymorphisms with hematologic toxicity was also assessed. All patients suffered from hematologic toxicity induced by the therapy, and the decrease in blood cell counts generally developed by the 7th–15th day after treatment, in line with the observations of previous studies<sup>10,17,70,71</sup>. Grade 3 lymphopenia, grade 4 neutropenia and grade 3 or 4 thrombocytopenia developed most frequently, and in the majority of the patients, the cell counts of monocytes, eosinophil granulocytes and red blood cells were lower than those in the normal reference populations (Supplementary Table 2, Table 5). However, the severity and incidence rates varied in patients with poor/intermediate and normal/rapid CYP2B6 metabolizing capacities (Table 5, Supplementary Fig. 1). Grade 3 lymphopenia occurred more frequently in patients with normal/rapid function than in those with poor/intermediate CYP2B6 function (Chi<sup>2</sup>: 6.044, N = 47, P = 0.015). The prevalence of severe thrombocytopenia (grades 3 and 4) was also higher in normal/rapid CYP2B6 metabolizers than in poor/intermediate metabolizer patients (Chi<sup>2</sup>: 5.588, N = 50, P = 0.018). Furthermore, chemotherapy-induced decrease in monocyte counts developed significantly more frequently in patients with normal/rapid than in those with poor/intermediate CYP2B6 function (OR 10.000; 95% CI 1.056–94.730; N = 45, P = 0.030). However, no association between CYP2B6 metabolizing capacity and the decrease in cell counts of neutrophil and eosinophil granulocytes as well as of red blood cells was observed in the patients during the 3-cycle therapy containing cyclophosphamide. In conclusion, the patients' CYP2B6 metabolizing capacity appeared to significantly influence the development of severe hematologic toxicity related to lymphopenia, thrombocytopenia and monocytopenia induced by the therapy, whereas no effect of CYP2B6 function on the reduction of neutrophils, eosinophils and red blood cells was observed in neuroblastoma patients.

**Association between patients' CYP genotypes and therapeutic outcome.** Although CYP2B6 plays a major role and CYP2C19 is the minor catalyst of cyclophosphamide metabolism, the association of the drug-metabolizing capacity of both CYP enzymes with therapeutic outcomes was retrospectively evaluated. CYP2B6 and CYP2C19 phenotypes of the patients were established on the basis of their genotypes, whereas the patients' response to anticancer therapy was defined as responders (complete remission and partial remission, N = 24/50) and non-responders (stable disease and progressive disease/exit, N = 26/50) on the basis of the primary tumour response (Tables 1 and 2). No significant differences were observed in the ratios of patients with various CYP2B6 or CYP2C19 phenotypes between responders and non-responders (CYP2B6 poor/intermediate : normal/rapid metabolizers 9:15 in responders and 11:15 in non-responders, P > 0.05; CYP2C19 poor/intermediate : normal : rapid/ultrarapid metabolizers 8:9:5 in responders and 4:13:9 in non-responders, P > 0.05) (Fig. 1). Multivariate binary logistic regression analysis was also performed to estimate the influence of CYP2B6 SNVs and haplotypes as well as of non-genetic factors, including sex and age, on treatment outcomes (Table 6). Although CYP2B6 genetic variability appeared to display no association with patients' response to chemotherapy, a significant contribution of sex and age to therapeutic outcomes was demonstrated. According to the model

	Poor/intermediate CYP2B6 metabolizers	Normal/rapid CYP2B6 metabolizers	P value
Lymphocytes (N = 47)			<b>0.015</b>
Grade 0	5.6% (1/18)	0.0% (0/29)	
Grade 1/2	22.2% (4/18)	3.4% (1/29)	
Grade 3	72.2% (13/18)	96.6% (28/29)	
Platelets (N = 50)			<b>0.018</b>
Grade 0	35.0% (7/20)	10.0% (3/30)	
Grade 1/2	15.0% (3/20)	10% (3/30)	
Grade 3/4	50.0% (10/20)	80.0% (24/30)	
Neutrophils (N = 49)			0.306
Grade 0	0.0% (0/19)	0.0% (0/30)	
Grade 1/2	10.5% (2/19)	3.3% (1/30)	
Grade 3/4	89.5% (17/19)	96.7% (29/30)	
Monocytes (N = 45)			<b>0.030</b>
> LLN*	27.8% (5/18)	3.7% (1/27)	
< LLN*	72.2% (13/18)	96.3% (26/27)	
Eosinophils (N = 45)			0.449
> LLN*	27.8% (5/18)	14.8% (4/27)	
< LLN*	72.2% (13/18)	85.2% (23/27)	
Red blood cells (N = 50)			0.489
> LLN*	15.0% (3/20)	26.7% (8/30)	
< LLN*	85.0% (17/20)	73.3% (22/30)	

**Table 5.** Evaluation of hematologic parameters indicating myelosuppression in patients with poor/intermediate and normal/rapid CYP2B6 function. Significant values are in bold. \*LLN: lower limit in normal reference population at the same age.



**Figure 1.** The association of cyclophosphamide therapeutic outcome with patients' CYP2B6 (A) and CYP2C19 genotype-based phenotypes (B). Patients were considered to be responders with complete remission and partial remission, whereas non-responders with stable disease and progressive disease/exit. CYP2B6 and CYP2C19 phenotypes were estimated on the basis of *CYP2B6* or *CYP2C19* genotypes according to the CPIC and PharmVar recommendations.

Models	Variables	Response to therapy		
		Coefficient B (SE)	Exp $\beta$	P value
SNVs, non-genetic factors <sup>a,c</sup>	Constant	23.31 (40,192)	1.338E+10	1.00
	g.-82T>C (rs34223104)	- 22.11 (40,192)	0.00	1.00
	g.15631G>T (rs3745274)	0.29 (1.47)	1.34	0.83
Model 1 (corrected $P \leq 0.01$ )	g.18053A>G (rs2279343)	0.45 (1.45)	1.58	0.75
	g.25505C>T (rs3211371)	0.38 (0.9)	1.46	0.67
	Sex	- 1.5 (0.72)	0.22	0.03
	Age	- 0.75 (0.74)	0.17	<b>0.01</b>
Haplotypes <sup>d</sup> , non-genetic factors <sup>b,e</sup>	Constant	21.83 (40,192)	3,041,354,571	1.00
	<i>CYP2B6</i> *4 (g.-82T/15631G/ <b>18053G</b> /25505C)	1.39 (1.22)	4.01	0.25
	<i>CYP2B6</i> *5 (g.-82T/15631G/18053A/ <b>25505T</b> )	0.52 (0.91)	1.68	0.56
Model 2 (corrected $P \leq 0.02$ )	<i>CYP2B6</i> *6 (g.-82T/ <b>15631T</b> / <b>18053G</b> /25505T)	0.73 (0.73)	2.08	0.32
	<i>CYP2B6</i> *22 (g.- <b>82C</b> /15631G/18053A/25505C)	- 21.99 (40,192)	0.00	1.00
	Sex	- 1.57 (0.73)	0.20	0.03
	Age	- 1.7 (0.75)	0.18	<b>0.02</b>
Estimated phenotype, non-genetic factors <sup>c,e</sup>	Constant	- 1.39 (0.77)	0.24	0.07
	Poor/intermediate	- 0.69 (0.68)	0.49	0.3
Model 3 (corrected $P \leq 0.02$ )	Sex	1.36 (0.69)	3.89	0.04
	Age	1.58 (0.71)	4.86	<b>0.02</b>

**Table 6.** Multivariate logistic regression analysis on response to cyclophosphamide therapy considering *CYP2B6* genetic polymorphisms, estimated phenotypes and non-genetic factors (age, sex). Significant values are in bold. <sup>a</sup>AIC: 41.63, BIC: 54.72 for model 1, <sup>b</sup>AIC: 44.11, BIC: 57.21 for model 2, <sup>c</sup>AIC: 25.46, BIC: 32.94, <sup>d</sup>In haplotypes, the polymorphic variants were indicated in bold. <sup>e</sup>Post-hoc power: 57.0%.

with *CYP2B6* SNVs or haplotypes, the primary tumour response was better in patients under 1.5 years than in older children, and girls were found to expect more favourable therapeutic outcomes than boys in both models ( $P = 0.03$ ) (Table 6).

## Discussion

*CYP2B6* is considered to be the major catalyst of CYP-mediated activation of cyclophosphamide, and a minor role is attributed to *CYP2C19*, whereas the inactivation pathways by these enzymes also lead to the formation of toxic metabolites, such as acrolein and chloroacetaldehyde<sup>10</sup>. Consequently, the remarkable genetic variability

of *CYP2B6* and *CYP2C19* is likely to influence the patients' response to cyclophosphamide, resulting in differences in therapeutic efficacy and development of side effects<sup>30</sup>. Therefore, pharmacogenetic testing may facilitate justification of cyclophosphamide-induced adverse events or weak therapeutic efficacy. However, a clear pharmacogenetic evidence for chemotherapeutic drugs in pediatric patients is limited, and the interpretation of pharmacogenetic data in children may be assisted by extrapolation from adults<sup>72,73</sup>. Although developmental expression patterns of several drug-metabolizing enzymes leading to different drug responses in children and adults have been reported<sup>74</sup>, the consequences of *CYP2B6* genetic variants in pediatric patients are expected to be identical to those in adults, because *CYP2B6* expression rapidly increases after birth and is constant after 1 year of age<sup>51,73</sup>. In contrast, the activity and protein expression of *CYP2C19* is low in young children and approaches the adult level only after 10 to 18 years of age<sup>75</sup>. Thus, in pediatric patients, *CYP2B6* catalyzed oxidation may become the principal route of cyclophosphamide metabolism, and *CYP2B6* genetic polymorphisms may influence the predisposition to cyclophosphamide-induced adverse reactions.

The active metabolite phosphoramidate mustard and toxic byproducts of cyclophosphamide metabolism induce clinically significant organ-specific side effects<sup>10,17</sup>. The present study focused on the impact of *CYP2B6* genetic variability on the development of liver and excretory system (kidneys and urinary bladder) injury as well as of hematologic toxicity in pediatric patients undergoing cyclophosphamide therapy. In these neuroblastoma patients, a significant association of *CYP2B6* genetic variants with liver injury and hematologic toxicity was observed, but not with renal and bladder injury. Poor/intermediate *CYP2B6* metabolizers carrying at least one *CYP2B6*\*6 allele and having reduced *CYP2B6* activity were assumed to produce low levels of toxic phosphoramidate mustard and acrolein due to diminished cyclophosphamide metabolism, that might explain the low incidence of liver and hematologic toxicity. Although, neuroblastoma considered to be the most prevalent extracranial solid tumour malignancy in childhood<sup>1,2</sup>, cyclophosphamide-induced toxicity related to the patients' *CYP2B6* and *CYP2C19* status has not been extensively investigated in patients with neuroblastoma. In the literature, cyclophosphamide-induced toxicity has been evaluated in patients with tumour malignancies other than neuroblastoma; therefore, our findings interpreting *CYP* polymorphisms and cyclophosphamide-related adverse reactions in pediatric patients with neuroblastoma appear to be the first. The rate of cyclophosphamide metabolism is considered to be an important factor in cyclophosphamide-induced toxicity<sup>10</sup>, and our results highlighted that estimating patients' cyclophosphamide metabolizing capacity by identification of clinically relevant *CYP* polymorphisms may predict cyclophosphamide-induced adverse reactions even in neuroblastoma patients. Our results were in line with the findings in Japanese breast cancer patients receiving a standard AC regimen (doxorubicin and cyclophosphamide) that grade 4 neutropenia hardly developed in *CYP2B6*\*6 carriers<sup>55</sup>. However, other studies found no association of hematologic toxicity with pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites or with *CYP2B6* polymorphisms<sup>19,34,53,57</sup>. Increased hydroxylation activity forming 4-hydroxycyclophosphamide was linked to a significant reduction of neutrophils and platelets and to low hemoglobin concentrations in pediatric patients with brain tumours that also confirmed the association between high bioactivation rate and increased risk of hematologic toxicity<sup>34</sup>. Transient elevation of serum bilirubin, alkaline phosphatase, ALT or aspartate aminotransferase levels has also been reported in patients undergoing chemotherapy with cyclophosphamide<sup>76,77</sup>; however, no link to *CYP2B6* genotype has been established<sup>52</sup>.

Sensitivity to cyclophosphamide appears to be increased in cells with reduced detoxification by aldehyde dehydrogenase (ALDH enzyme). *ALDH1A1* and *ALDH3A1* enzymes catalyze the conversion of aldophosphamide, the precursor of phosphoramidate mustard, to carboxyphosphamide, which has no alkylating and cytotoxic activity<sup>17</sup>. Liver cells are less sensitive to cyclophosphamide because of the high level of *ALDH*<sup>16</sup>, that might explain the mild hepatotoxicity observed in patients with neuroblastoma in the present study (Supplementary Table 2). However, Ming et al. reported severe and prolonged hepatotoxicity in a breast cancer patient after two cycles of cyclophosphamide, which was attributed to the combined effect of the *CYP2B6* variant with high cyclophosphamide 4-hydroxylation activity and the *ALDH3A1* genetic variant with reduced detoxification activity<sup>78</sup>. Hematopoietic progenitors or lymphocyte subsets express low levels of *ALDH*, predisposing these cells to have a low inactivation rate and to be more sensitive to the bioactivated compound; therefore, enhanced hematologic toxicity is expected to emerge<sup>16,79,80</sup> as it was found in neuroblastoma patients (Supplementary Table 2). Severe (grade 3 and grade 4) hematologic toxicity (leukocytopenia, and neutropenia) was observed in more than half of the adult Japanese cancer patients treated with cyclophosphamide, and grade 4 toxicity was associated with high 4-hydroxycyclophosphamide exposure and *CYP2B6* polymorphisms<sup>33</sup>. Hematologic toxicity of cyclophosphamide has also been reported in 12–48% of pediatric patients with solid tumour malignancies<sup>35</sup>, whereas hemorrhagic cystitis or excretory system-related toxicities are relatively uncommon after cyclophosphamide administration<sup>52,76,77,81</sup>. Although Muniz et al. reported an association between *CYP2B6*\*4 and hemorrhagic cystitis in adult patients treated with high-dose cyclophosphamide, according to our findings in patients with neuroblastoma, bloody urine symptoms were rarely observed<sup>82</sup>.

Conflicting results have been reported regarding patients' responses to cyclophosphamide-containing chemotherapy. Several studies have revealed a significant association of favourable or unfavourable treatment outcomes with *CYP2B6* or *CYP2C19* pharmacogenetics, whereas others have hardly demonstrated any relationship between treatment response and *CYP* polymorphisms<sup>44,53,54,83–86</sup>. According to Pinto et al., the 3-year event-free survival of rhabdomyosarcoma patients after vincristine/actinomycin/cyclophosphamide (VAC) therapy was not related to any SNVs in drug-metabolizing enzymes, including *CYP2B6* and *CYP2C19*, whereas Labib et al. revealed favourable therapeutic outcomes in patients carrying the *CYP2B6* K262R variant with the same malignancy and therapy protocol<sup>54,86</sup>. The cyclophosphamide therapy in the neuroblastoma patients of the present study followed the treatment protocols considering patients' age, bodyweight and risk stratification. It should be noted that their chemotherapy regimen contained additional anticancer drugs, such as vincristine, adriamycin, cisplatin, carboplatin or etoposide, according to pretreatment risk stratification and risk-adapted therapeutic protocols. The overall response rate was found to be associated with age categorized as younger and older than 1.5 years, and a



trend was also observed toward significance with sex; however, neither the *CYP2B6* or *CYP2C19* haplotypes nor genotype-based phenotypes had an influence on therapeutic outcomes in neuroblastoma patients. Patients' age at the time of neuroblastoma diagnosis is one of the most important risk factors for risk stratification. Children under 1–1.5 years of age can expect better treatment outcomes than older subjects, regardless of their favourable or unfavourable disease staging<sup>5,87–90</sup>. Gender is not considered to be a prognostic factor in risk stratification<sup>87,88,91</sup>; however, several studies have indicated that female patients can expect more favourable prognosis according to survival analysis<sup>89,90,92</sup>. The SIOP Europe Neuroblastoma Group study demonstrated that boys with stage 1 disease without MYCN (*v-myc* myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived) gene amplification suffered more relapse episodes during the 5-year follow-up period than did female patients<sup>93</sup>.

The present study had some limitations. First, both low- and high-risk neuroblastoma patients were included in this study; therefore, various cyclophosphamide-containing chemotherapy regimens were applied. However, the distribution of low- and high-risk subjects in the *CYP2B6* and *CYP2C19* metabolizer groups was homogeneous. Second, the association of the development of adverse reactions and therapeutic responses with the genetic variability of CYP enzymes responsible for the first steps of cyclophosphamide metabolism was established, and other enzymes catalyzing the subsequent metabolic steps were not evaluated. Third, the toxicity data of the patients were retrospectively analysed, and adverse reaction data could not be systematically collected.

## Conclusion

Although the pharmacokinetic variability of cyclophosphamide and its toxic byproducts is well documented in adults<sup>20,30–34</sup>, the potential contribution of genetic polymorphisms of CYP enzymes involved in cyclophosphamide metabolic pathways to the treatment outcome and development of side effects is not completely clear. In the present study, the contribution of pharmacogenetic variability in *CYP2B6* and *CYP2C19* to treatment efficacy and cyclophosphamide-induced side effects was evaluated in pediatric patients with neuroblastoma. Cyclophosphamide-induced hepatorenal toxicity was mild, whereas hematologic toxicities were severe and occurred in all patients. After multiple cycles of cyclophosphamide treatments, the incidence of liver injury and hematologic toxicities, including lymphopenia, thrombocytopenia and monocytopenia, but not excretory system (kidneys, urinary bladder) toxicities were associated with the patients' *CYP2B6* metabolizer phenotype. Furthermore, the therapeutic response to cyclophosphamide appeared to depend on the patients' age and gender; however, *CYP2B6* or *CYP2C19* metabolizer phenotypes did not influence the treatment outcome. Our results may contribute to a better understanding of the impact of *CYP2B6* variability on cyclophosphamide-induced side effects.

## Data availability

The data that support the findings of this study have been deposited in the European Variation Archive (EVA)<sup>94</sup> at EMBL-EBI under accession number PRJEB61781 (<https://www.ebi.ac.uk/eva/?eva-study=PRJEB61781>).

Received: 2 May 2023; Accepted: 18 July 2023

Published online: 21 July 2023

## References

- Steliarova-Foucher, E. *et al.* International incidence of childhood cancer, 2001–2010: A population-based registry study. *Lancet Oncol.* **18**, 719–731 (2017).
- Georgakis, M. K. *et al.* Neuroblastoma among children in Southern and Eastern European cancer registries: Variations in incidence and temporal trends compared to US. *Int. J. Cancer.* **142**, 1977–1985 (2018).
- Qui, B. & Matthay, K. K. Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 515–533 (2022).
- Meany, H. J. Non-high-risk neuroblastoma: Classification and achievements in therapy. *Children* **6**, 5. <https://doi.org/10.3390/children6010005> (2019).
- Bhat, N. & McGregor, L. in *Neuroblastoma: Current State and Recent Updates* (ed. Gowda, C.) 1–20 (InTech, 2017).
- Whittle, S. B. *et al.* Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **17**, 369–386 (2017).
- Brock, N. The history of the oxazaphosphorine cytostatics. *Cancer* **78**, 542–547 (1996).
- Highley, M. S., Landuyt, B., Prenen, H., Harper, P. G. & De Bruijn, E. A. The nitrogen mustards. *Pharmacol. Rev.* **74**, 552–599 (2022).
- Roy, P., Yu, L. J., Crespi, C. L. & Waxman, D. J. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 655–666 (1999).
- De Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Rodenhuis, S. & Beijnen, J. H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin. Pharmacokinet.* **44**, 1135–1164 (2005).
- Raccor, B. S. *et al.* Potential contribution of cytochrome P450 2B6 to hepatic 4-hydroxycyclophosphamide formation in vitro and in vivo. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 54–63 (2012).
- Dockham, P. A., Lee, M. O. & Sládek, N. E. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyze the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2453–2469 (1992).
- Giorgianni, F., Bridson, P. K., Sorrentino, B. P., Pohl, J. & Blakley, R. L. Inactivation of aldophosphamide by human aldehyde dehydrogenase isozyme 3. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 325–338 (2000).
- Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. & Kiang, D. T. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: A retrospective study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 309–321 (2002).
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* **7**, 11018–11032 (2016).
- Jones, R. J. *et al.* Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* **85**, 2742–2746 (1995).
- Emadi, A., Jones, R. J. & Brodsky, R. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 638–647 (2009).
- Deleve, L. D. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: Role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology* **24**, 830–837 (1996).

19. McDonald, G. B. *et al.* Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity, and mortality following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **101**, 2043–2048 (2003).
20. De Jonge, M. E., Huitema, A. D. R., Beijnen, J. H. & Rodenhuis, S. High exposures to bioactivated cyclophosphamide are related to the occurrence of veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy. *Br. J. Cancer* **94**, 1226–1230 (2006).
21. Moghe, A. *et al.* Molecular mechanisms of acrolein toxicity: Relevance to human disease. *Toxicol. Sci.* **143**, 242–255 (2015).
22. Gupta, S., Portales-Castillo, I., Daher, A. & Kitchlu, A. Conventional chemotherapy nephrotoxicity. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **28**, 402–414.e1 (2021).
23. Lawson, M., Vasilaras, A., De Vries, A., Mactaggart, P. & Nicol, D. Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **42**, 309–317 (2008).
24. MacAllister, S. L., Martin-Brisac, N., Lau, V., Yang, K. & O'Brien, P. J. Acrolein and chloroacetaldehyde: An examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **202**, 259–266 (2013).
25. Mills, K. A., Chess-Williams, R. & McDermott, C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: Chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Arch. Toxicol.* **93**, 3291–3303 (2019).
26. Bagley, C. M., Bostick, F. W. & DeVita, V. T. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res.* **33**, 226–233 (1973).
27. Tasso, M. J. *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in paediatric patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 207–211 (1992).
28. Yule, S. M. *et al.* Cyclophosphamide pharmacokinetics in children. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 13–19 (1996).
29. McCune, J. S. *et al.* Population pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites in children with neuroblastoma: A report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Pharmacol.* **49**, 88–102 (2009).
30. Helsby, N. A., Yong, M., van Kan, M., de Zoysa, J. R. & Burns, K. E. The importance of both CYP2C19 and CYP2B6 germline variations in cyclophosphamide pharmacokinetics and clinical outcomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **85**, 1925–1934 (2019).
31. Boddy, A. V., Furtun, Y., Sardas, S., Sardas, O. & Idle, J. R. Individual variation in the activation and inactivation of metabolic pathways of cyclophosphamide. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 1744–1748 (1992).
32. Yule, S. M., Price, L., McMahon, A. D., Pearson, A. D. J. & Boddy, A. V. Cyclophosphamide metabolism in children with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 455–460 (2004).
33. Nakajima, M. *et al.* Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the pharmacokinetics/ pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 431–445 (2007).
34. Campagne, O. *et al.* Exposure-toxicity association of cyclophosphamide and its metabolites in infants and young children with primary brain tumors: Implications for dosing. *Clin. Cancer Res.* **26**, 1563–1573 (2020).
35. Barnett, S. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacogenetics of cyclophosphamide in a neonate and infant childhood cancer patient population. *Pharmaceuticals* **14**, 272. <https://doi.org/10.3390/ph14030272> (2021).
36. Zanger, U. M. & Klein, K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): Advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Genet.* **4**, 24 (2013).
37. Desta, Z. *et al.* PharmVar GeneFocus: CYP2B6. *Clin. Pharmacol. Ther.* **110**, 82–97 (2021).
38. Mangó, K., Kiss, Á. F., Fekete, F., Erdős, R. & Monostory, K. CYP2B6 allelic variants and non-genetic factors influence CYP2B6 enzyme function. *Sci. Rep.* **12**, 2984. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07022-9> (2022).
39. Ilic, K. *et al.* The Influence of Sex, Ethnicity, and CYP2B6 genotype on bupropion metabolism as an index of hepatic CYP2B6 activity in humans. *Drug Metab. Dispos.* **41**, 575–581 (2013).
40. Kharasch, E. D., Regina, K. J., Blood, J. & Friedel, C. Methadone pharmacogenetics: CYP2B6 polymorphisms determine plasma concentrations, clearance, and metabolism. *Anesthesiology* **123**, 1142–1153 (2015).
41. Langmia, I. M. *et al.* CYP2B6 functional variability in drug metabolism and exposure across populations: Implication for drug safety, dosing, and individualized therapy. *Front. Genet.* **12**, 692234 (2021).
42. Desta, Z. *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for CYP2B6 and efavirenz-containing antiretroviral therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **106**, 726–733 (2019).
43. Veal, G. J. *et al.* Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Cancer* **55**, 56–64 (2016).
44. Shu, W. *et al.* Cytochrome P450 genetic variations can predict mRNA expression, cyclophosphamide 4-hydroxylation, and treatment outcomes in Chinese patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Pharmacol.* **57**, 886–898 (2017).
45. Zhang, H. *et al.* Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: A charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome P450-reductase complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 803–809 (2011).
46. Zhou, Y. & Lauschke, V. M. The genetic landscape of major drug metabolizing cytochrome P450 genes: An updated analysis of population-scale sequencing data. *Pharmacogenomics J.* **22**, 284–293 (2022).
47. Bumpus, N. N., Sridar, C., Kent, U. M. & Hollenberg, P. F. The naturally occurring cytochrome P450 (P450) 2B6 K262R mutant of P450 2B6 exhibits alterations in substrate metabolism and inactivation. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 795–802 (2005).
48. Kharasch, E. D. & Crafford, A. Common polymorphisms of CYP2B6 influence stereoselective bupropion disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.* **105**, 142–152 (2019).
49. Zunft, J. *et al.* A natural CYP2B6 TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1772–1782 (2005).
50. Li, H., Ferguson, S. S. & Wang, H. Synergistically enhanced CYP2B6 inducibility between a polymorphic mutation in CYP2B6 promoter and pregnane X receptor activation. *Mol. Pharmacol.* **78**, 704–713 (2010).
51. Pearce, R. E. *et al.* Developmental expression of CYP2B6: A comprehensive analysis of mRNA expression, protein content and bupropion hydroxylase activity and the impact of genetic variation. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 948–958 (2016).
52. Ekhardt, C., Rodenhuis, S., Smits, P. H. M., Beijnen, J. H. & Huitema, A. D. R. Relations between polymorphisms in drug-metabolising enzymes and toxicity of chemotherapy with cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin. *Pharmacogenet. Genomics* **18**, 1009–1015 (2008).
53. Haroun, F. *et al.* Effects of CYP2B6 genetic polymorphisms in patients receiving cyclophosphamide combination chemotherapy for breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 207–214 (2015).
54. Labib, R. M., Abdelrahim, M. E. A., Elnadi, E., Hesham, R. M. & Yassin, D. CYP2B6rs2279343 is associated with improved survival of pediatric rhabdomyosarcoma treated with cyclophosphamide. *PLoS ONE* **11**, e0158890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158890> (2016).
55. Tsuji, D. *et al.* Drug-related genetic polymorphisms affecting severe chemotherapy-induced neutropenia in breast cancer patients: A hospital-based observational study. *Medicine* **95**, e5151. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005151> (2016).
56. Helsby, N., Yong, M., Burns, K., Findlay, M. & Porter, D. Cyclophosphamide bioactivation pharmacogenetics in breast cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **88**, 533–542 (2021).
57. Hwang, M. *et al.* Lack of association of CYP2B6 pharmacogenetics with cyclophosphamide toxicity in patients with cancer. *Support. Care Cancer* **30**, 7355–7363 (2022).
58. Turpeinen, M. & Zanger, U. M. Cytochrome P450 2B6: Function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metab. Drug Interact.* **27**, 185–197 (2012).
59. Lindley, C. *et al.* The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 814–822 (2002).

60. Slavic, I. *et al.* Korf BR: Myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res.* **50**, 1459–1463 (1990).
61. Huang, M. & Weiss, W. A. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a014415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014415> (2013).
62. Peinemann, F., Tushabe, D. A., van Dalen, E. C. & Berthold, F. Rapid COJEC versus standard induction therapies for high-risk neuroblastoma. *Cochrane Database Syst. Rev.* **19**, 010774. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010774.pub2> (2015).
63. Park, J. R. *et al.* Revisions to the international neuroblastoma response criteria: A consensus statement from the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2580–2587 (2017).
64. Stephens, M., Smith, N. J. & Donnelly, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 978–989 (2001).
65. Stephens, M. & Scheet, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 449–462 (2005).
66. Kiss, Á. F., Vaskó, D., Déri, M. T., Tóth, K. & Monostory, K. Combination of CYP2C19 genotype with non-genetic factors evoking phenocopy improves phenotype prediction. *Pharmacol. Rep.* **70**, 525–532 (2018).
67. Peduzzi, P., Concato, J., Kemper, E., Holford, T. R. & Feinstein, A. R. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J. Clin. Epidemiol.* **49**, 1373–1379 (1996).
68. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G. & Buchner, A. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* **39**, 175–191 (2007).
69. Ionova, Y. *et al.* CYP2C19 allele frequencies in over 2.2 million direct-to-consumer genetics research participants and the potential implication for prescriptions in a large health system. *Clin. Trans. Sci.* **13**, 1298–1306 (2020).
70. Fraiser, L. H., Kanekal, S. & Kehrer, J. P. Cyclophosphamide toxicity. Characterizing and avoiding the problem. *Drugs* **42**, 781–795 (1991).
71. Langford, C. A. Complications of cyclophosphamide therapy. *Eur. Arch. Otorhinolaryngology* **254**, 65–72 (1997).
72. Barker, C. I. S. *et al.* Pharmacogenomic testing in paediatrics: Clinical implementation strategies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **88**, 4297–4310 (2022).
73. Mlakar, V., Curtis, P. H. D., Uppugunduri, C. R. S., Krajcinovic, M. & Ansari, M. Pharmacogenomics in pediatric oncology: Review of gene–drug associations for clinical use. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1502. <https://doi.org/10.3390/ijms17091502> (2016).
74. Hines, R. N. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol. Ther.* **118**, 250–267 (2008).
75. Koukouritaki, S. B. *et al.* Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 965–974 (2004).
76. Ali, K. *et al.* Detection of the incidence of infections and acute biochemical changes in diffused large B-cell lymphoma patients treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) with and without rituximab. *Curr. Drug Saf.* **13**, 102–106 (2018).
77. Huitema, A. D. R. *et al.* Relationship between exposure and toxicity in high-dose chemotherapy with cyclophosphamide, thiopeta and carboplatin. *Ann. Oncol.* **13**, 374–384 (2002).
78. Ming, Z. *et al.* Severe and prolonged cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in a breast cancer patient carrying a CYP2B6\*7 variant. *Pharmacogenomics* **20**, 1119–1124 (2019).
79. Kastan, M. B. *et al.* Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* **75**, 1947–1950 (1990).
80. McCowage, G. B. *et al.* Treatment of children with poor risk solid tumors by further escalation of the VETOPEC regimen including very high-dose cyclophosphamide and peripheral stem cell support: An Australian and New Zealand Children's Hematology and Oncology Group study. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 958–964 (2011).
81. Harapap, Y., Yanuar, A., Muhammad, C., Melhan, M. & Purwanto, D. J. Quantification of 3-hydroxypropyl mercapturic acid in the urine of patients with breast cancer to monitor cyclophosphamide toxicity. *Ther. Drug Monit.* **42**, 548–553 (2020).
82. Muniz, P. *et al.* Association between gene polymorphisms in the cyclophosphamide metabolism pathway with complications after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Front. Immunol.* **13**, 1002959. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1002959> (2022).
83. Bray, J. *et al.* Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *Br. J. Cancer* **102**, 1003–1009 (2010).
84. Vukovic, V. *et al.* Association of SLC28A3 gene expression and CYP2B6\*6 allele with the response to fludarabine plus cyclophosphamide in chronic lymphocytic leukemia patients. *Pathol. Oncol. Res.* **26**, 743–752 (2020).
85. Falk, I. J., Khan, M. S., Thunell, L., Nahi, H. & Gréen, H. Association of CYP2B6 genotype with survival and progression free survival in cyclophosphamide treated multiple myeloma. *J. Cancer Ther.* **3**, 20–27 (2012).
86. Pinto, N. *et al.* Pharmacogenomic associations of cyclophosphamide pharmacokinetic candidate genes with event-free survival in intermediate-risk rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* **68**, e29203. <https://doi.org/10.1002/pbc.29203> (2021).
87. Saito, T. *et al.* Trends of survival in neuroblastoma and independent risk factors for survival as a single institution. *Med. Pediatr. Oncol.* **29**, 197–205 (1997).
88. Cotterill, S. J. *et al.* Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: Results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982–1992. *Eur. J. Cancer* **36**, 901–908 (2000).
89. Aydın, G. B. *et al.* Neuroblastoma in Turkish children: Experience of a single centre. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **31**, 471–480 (2009).
90. Graef, S., Irwin, M. S. & Wan, M. J. Incidence and prognostic role of the ocular manifestations of neuroblastoma in children. *Am. J. Ophthalmol.* **213**, 145–152 (2020).
91. Pritchard, J., Barnes, J. M., Germond, S. M. & Wallendzusz, K. R. Gender and survival in neuroblastoma. *Lancet* **1**, 328 (1989).
92. Bernardi, B. D. *et al.* Stage 4 s neuroblastoma: Features, management and outcome of 268 cases from the Italian Neuroblastoma Registry. *Ital. J. Pediatr.* **45**, 8. <https://doi.org/10.1186/s13052-018-0599-1> (2019).
93. Bernardi, B. D. *et al.* Treatment of localised resectable neuroblastoma: Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *Br. J. Cancer* **99**, 1027–1033 (2008).
94. Cezard, T. *et al.* The European variation archive: A FAIR resource of genomic variation for all species. *Nucleic Acids Res.* **50**, D1216–1220 (2022).

## Acknowledgements

This work was supported by the Grants of 2018-1.2.1-NKP-2018-00005 and TKP2021-EGA-31 (National Research, Development and Innovation Fund of Hungary), VEKOP-2.3.3-15-2017-00014 (Territorial Development Operational Programs of Prime Minister's Office in Hungary) and ELIXIR-HU-2019-HCNV (ELIXIR).

### Author contributions

Study conception and design: K.Monostory, M.G.; patient recruiting and diagnosis: E.B., M.G., T.B.; histopathology: T.M.; sample preparation, CYPtesting, data acquisition: K.Mangó, F.F., Á.F.K., R.E., statistical analysis: J.F.; data analysis and interpretation: K.Mangó, K.Monostory; manuscript drafting: K.Mangó, K.Monostory. All authors reviewed the manuscript and approved the final version.

### Funding

Open access funding provided by ELKH Research Centre for Natural Sciences.

### 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/s41598-023-38983-0>.

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

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://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) 2023