

**A *CYP2B6* Genotípus Alapú Fenotípus Becslés és
Alkalmazhatósága Ciklofoszfamiddal kezelt
Neuroblasztóma Betegeknél**

Doktori Tézisek

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

1 Bevezetés

A gyógyszeres terápiára adott válasz egyéni különbségeinek hátterében gyakran a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedésének variabilitása áll, melyet az egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség határoz meg. A gyógyszer-metabolizáló citokróm P450 (CYP) enzimek genetikai variánsai és a fenokonvertáló nem-genetikai tényezők (pl. gyógyszeres terápia, kor, nem, ko-morbiditások, gyulladással együtt járó állapotok) jelentős funkcióbeli változásokat okoznak, így hozzájárulva az interindividually eltérő metabolikus kapacitás kialakulásához. A máj gyógyszer-metabolizáló CYP enzimeit, köztük a CYP2B6, kiemelt szerepet játszanak számos gyógyszerhatóanyag, pl. kemoterápiás szer metabolizmusában. A daganatellenes gyógyszeres terápia során mind felnőtteknél, mind gyermekeknél előfordulhatnak súlyos, akár fatális kimenetelű gyógyszer-kölcsönhatások, illetve elégtelen terápiás válasz esetén kedvezőtlen kimenetelű terápia, melyek kialakulásában többek között a gyógyszer-metabolizáló CYP enzimek genetikai variabilitásának jelentőségét emelték ki. Gyermekeknél korlátozottan állnak rendelkezésre farmakogenetikai vizsgálati eredmények, így a felnőttek bevonásával készített vizsgálatok eredményeiből becsülhetjük a gyermekeknél várható eltéréseket. A neuroblasztóma 5 év alatti gyermekek egyik leggyakoribb extrakraniális daganatos megbetegedése. A daganatellenes terápiás protokoll részeként ciklofoszfamid alkilálószer alkalmazhatnak a betegek kockázati besorolásától függetlenül. A ciklofoszfamid bioaktivációjában, azaz a daganatellenes hatásért felelős foszforamid mustár képződésében elsődleges a CYP2B6, míg másodlagos a CYP2C19 enzim szerepe. Továbbá a metabolizmus során toxikus metabolitok (akrolein és klóracetaldehid) is képződnek. A ciklofoszfamid terápiát követően máj, vese és húgyhólyag károsodást (haemorrhagiás cystitis), valamint mieloszuppressziót figyeltek meg. Az egyes szervek/sejtek ciklofoszfamid érzékenysége eltérő, amely a sejtek aldehid dehidrogenáz (ALDH) enzim szintjének függvénye. Neuroblasztóma betegek esetén a ciklofoszfamid metabolizmusában jelentős CYP enzimek funkcióbeli diverzitása hozzájárulhat a terápia hatékonyságához, illetve a toxikus metabolitok képződésének mértékén keresztül a toxikus események kialakulásához. A gyógyszer-metabolizmus egyedi különbségeit meghatározó tényezők feltárásával és szerepük megismerésével hozzájárulhatunk a biztonságos, mégis hatékony személyre szabott gyógyszeres terápiák kialakításához.

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* egybázist érintő szekvencia variánsok (SNV-k, single nucleotide variations) 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 választ.

- Vizsgálataink megkezdése előtt célunk volt egy PCR (polimeráz láncreakció) 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 májszövet donorok mintái a Semmelweis Egyetem Sebészeti, Transzplantációs és Gasztroenterológiai Klinikájáról (Budapest) származtak. A retrospektív vizsgálatokhoz neuroblasztóma betegek vérmintáit használtuk, a betegeket a Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati Központjában (Budapest) kezelték. 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 Helsinkai Egyezmény).

3.2 Neuroblasztómával kezelt betegek terápiaja

A betegek terápia kimenetelét a Gyermekgyógyászati Központ munkatársai az *International Neuroblastoma Response Criteria* (INRC) elvei alapján állapították 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. A májat és a kiválasztószervrendszert érintő károsodást a szérum paraméterek (alanin-aminotranszferáz (GPT), gamma-glutamil-transzferáz (GGT), kreatinin, nátrium és kálium) koncentrációjának emelkedése, valamint a véres vizelet megjelenése alapján állapítottuk meg. A hematológiai toxicitást a vérsejtek/alakos elemek (limfociták, neutrofil és eozinofil granulociták, trombociták, monociták és vörösvértestek) számának csökkenése jelezte. A toxicitás mértékét a *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria* (CTC, verzió 2.0) kritériumrendszer alapján határoztuk meg. Toxikus tünetnek tekintettük, ha a szérum paraméterek koncentrációja növekedett vagy a vér alakos elemek száma csökkent az alapszinthez képest, és túllépték a normál referencia tartomány felső vagy alsó határértékét.

3.3 CYP2B6-szelektív aktivitás és mRNS expresszió meghatározása

A CYP2B6-szelektív *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás meghatározását humán májszövetből készített mikroszóma-preparátumon végeztük el, amely tartalmazza az endoplazmás retikulumhoz kötött CYP enzimeket. Az enzimreakció a CYP működéshez szükséges NADPH-regeneráló rendszert, humán máj mikroszómát és CYP2B6-szelektív szubsztrátot (*S*-mefenitoin) tartalmazta. Az *S*-mefenitoinból képződő nirvanol mennyiségi meghatározását HPLC-UV módszerrel végeztük. Az *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitás adatokat pmol nirvanol/(mg fehérje*perc) -ben adtuk meg.

A májszövet mintákból a totál RNS izolálását, illetve az RNS minták reverz transzkripcióját követően a CYP2B6 mRNS mennyiségi meghatározása valósídjú PCR alkalmazása és relatív mennyiségi meghatározás során történt. A g.15631G>T (rs3745274) SNV jelenlétében aberráns mRNS-variáns íródik át, melyből hiányzik részben vagy egészben a 4.-5.-6. exon, és amely csökkent CYP2B6 mRNS expressziót és enzimaktivitást eredményez. Vizsgálatunkban csupán a teljes hosszúságú CYP2B6 mRNS-t detektáltuk, mivel az expresszió meghatározásához alkalmazott *forward* és *reverse* primerek a 3. és 4. exonokhoz kötődnek.

3.4 CYP haplotípus és genotípus meghatározás

Genomi DNS izolálást követően a *CYP2B6* SNV-k meghatározását a donorok májszövet mintáiból, illetve a daganatos gyermekek vérmintáiból izolált genomi DNS templátok felhasználásával végeztük el. Validált TaqManTM 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. A g.18053A>G nukleotidcsere (rs2279343) meghatározására kétlépéses kimutatási módszer állítottunk be. A pre-amplifikáció a PCR BIO VeriFi Master Mix (PCR Biosystems Ltd., London, Egyesült Királyság) alkalmazásával ment végbe, amelynek *touchdown* 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 a Luminaris Probe qPCR Master Mix-et (Thermo Fisher Scientific) tartalmazta, illetve templátként a pre-amplifikációban képződő *CYP2B6*-specifikus amplikont alkalmaztuk 100-szoros hígításban. 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 SNV adatok alapján a *CYP2B6**4, *CYP2B6**5, *CYP2B6**6, *CYP2B6**9, illetve *CYP2B6**22 haplotípusokat a PHASE v2.1.1 szoftver alkalmazásával becsültük. Továbbá, neuroblasztóma betegek esetén a *CYP2C19* g.19154G>A (rs4244285), g.17948G>A (rs4986893), g.1A>G (rs28399504), illetve g.-806C>T (rs12248560) SNV-eket és *CYP2C19**2, *CYP2C19**3, *CYP2C19**4, illetve *CYP2C19**17 haplotípusokat is kimutattuk. A *CYP2B6*, valamint *CYP2C19* genotípus alapú fenotípus becslést a CPIC kritériumrendszere, valamint a PharmVar ajánlásai alapján végeztük el és soroltuk be az egyéneket gyenge, intermedier, normál vagy gyors/ultragyors metabolizáló kategóriákba.

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 mRNS expressziójának (függő változók), 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 fenotípust meghatározó genetikai és nem-genetikai tényezők

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

A kaukázusi fehér populációban egyik leggyakrabban előforduló SNV, a g.18053A>G, amelynek meghatározására alkalmas PCR-esszé nem elérhető kereskedelmi forgalomban. 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. A *nested* PCR elve alapján két primer-párt alkalmaztunk a meghatározási módszer két reakciójában a *CYP2B6*-specifitásának növelésére és a *CYP2B7P* amplifikációjának visszaszorítására. A pre-amplifikáció során alkalmazott primerpár egy viszonylag hosszú (~1275 bp) amplikont hozott létre, mely a 4. introntól a 6. intronig átívelő genomi régiókat tartalmazta. Az első, pre-amplifikációs primerpár kötőhelyét a 4. és 6. intron olyan génszakaszaira terveztük, mely alacsony homológiát mutatott a *CYP2B6* és *CYP2B7P* gének között. A reakció során a primerek *CYP2B6* génspecifikus hibridizációját a *touchdown* PCR hőmérsékleti protokollal 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, így biztosítva a *CYP2B6*-specifikus primer-kötődés termodinamikai feltételeit. A második reakcióban a TaqMan-próbák alkalmazásán alapuló alléldiszkriminációhoz a pre-amplifikált terméket alkalmaztuk templatként 100x hígításban. A reakció során egy második primerpárral, valamint a mutációt nem hordozó és a mutációt hordozó allélokra tervezett próba szekvenciákkal rövid, ~137 bp-os amplikont hoztunk létre az 5. exonon az rs2279343 mutációs pontnál.

A pre-amplifikáció *CYP2B6*-specifitását igazoltuk egy *CYP2B6*-specifikus és *CYP2B7P*-specifikus primert tartalmazó reakcióban. Kimutattuk, hogy a pre-amplifikáció során több mint 5000-szer nagyobb mennyiségben képződött a *CYP2B6*-specifikus amplikon a *CYP2B7P*-specifikus amplikon mennyiségéhez képest. Az SNV-diszkrimináció pontosságát Sanger-szekvenálással igazoltuk.

A májszövet donorok *CYP2B6* genotípusa

Humán szervdonorok *CYP2B6* genotípusát a kereskedelmi forgalomban kapható SNV-esszék, illetve az általunk kidolgozott kimutatási módszer alkalmazásával (g.-82T>C (rs34223104), g.15631G>T (rs3745274), g.18053A>G (rs2279343) és g.25505C>T (rs3211371) SNV) állapítottuk meg. Az eredmények alapján csökkent (*CYP2B6**6, *CYP2B6**9) és emelkedett (*CYP2B6**4, *CYP2B6**22) enzimaktivitást okozó, illetve fenotípust nem módosító (*CYP2B6**5) haplotípusokat különítettük el, melyek gyakorisága hasonlóan bizonyult a kaukázusi populáció gyakorisági adataihoz. A *CYP2B6* genotípusból becsült fenotípus alapján a szövetdonorok fele normál metabolizálónak bizonyult, több mint egyharmaduk (36,1%) intermedier metabolizmussal rendelkezett, míg csupán kevesebb, mint 10%-uk volt gyenge vagy gyors metabolizáló.

A májszövet minták *CYP2B6* fenotípusának jellemzése

A májszövet minták *CYP2B6* fenotípusát a *CYP2B6*-szelektív enzimaktivitás alapján is meghatároztuk. A mikroszomális *CYP2B6* *S*-mefenitoin *N*-demetiláz aktivitások közel 100-szoros variabilitást mutattak. Az aktivitás értékek gyakorisági eloszlása alapján gyenge (PM), intermedier (IM) és extenzív vagy gyors (EM) metabolizáló csoportokat különítettünk el. Továbbá a májszövet minták *CYP2B6* aktivitása és mRNS expressziója között szignifikáns összefüggést figyeltünk meg.

A *CYP2B6* fenotípust meghatározó genetikai és nem-genetikai tényezők

A máj *CYP2B6* fenotípusára számos genetikai variáns jelentős hatással bír, illetve a szövetdonorok kórtörténetében számos fenokonvertáló nem-genetikai tényező a *CYP2B6*-specifikus indukálószer terápia (diazepam, dexametazon, metilprednizolon, felodipin, kortizon, midazolam) és gátlószer terápia (amlodipin), illetve nem *CYP*-specifikus amoxicillin+klavulánsav terápia és krónikus alkoholfogyasztás volt fellelhető. Azonban, a donorok életkora vagy neme nem befolyásolta a *CYP2B6* aktivitást. A genotípus-fenotípus kategóriák összehasonlíthatósága érdekében egységesen négy fenotípus kategóriát határoztunk meg mind a *CYP2B6* genotípus alapján (gyenge-intermedier-normál-gyors), mind a *CYP2B6* enzimaktivitás és mRNS expresszió alapján (PM-alacsony IM-magas IM-EM) a medián aktivitást, illetve medián mRNS expressziót küszöbértékként használva.

Minden genotípus csoportban jelentős variabilitást mutatott mind a CYP2B6 aktivitás, mind a mRNA expresszió. A *CYP2B6* genotípus alapján gyenge metabolizáló fenotípusúnak minősített májszövet donorok (azaz mindkét alléljukon csökkent funkciójú enzimet kódoló, *CYP2B6**6/*6 vagy *CYP2B6**6/*9 genotípussal rendelkező donorok) közül csupán egy rendelkezett alacsony enzimaktivitással, illetve mRNA expresszióval. Számos alacsony/magas intermedier vagy emelkedett fenotípus kategóriákba tartozó szövetdonor esetében indukálószer terápia (metilprednizolon, dexametazon, diazepam) magyarázta a genotípus alapján várttól eltérő, emelkedett CYP2B6 metabolizáló fenotípust. Az egy normál és egy csökkent funkciójú enzimet kódoló allélt hordozóknál (*CYP2B6**1/*6, *CYP2B6**5/*6, *CYP2B6**1/*9 vagy *CYP2B6**4/*6 genotípus) az irodalom szerint alacsony intermedier CYP2B6 metabolizáló fenotípus várható. Alacsony mRNA expressziójú, illetve aktivitású májszövet mintáknál a donorok kórtörténetében előfordultak az alacsony fenotípus kialakulását magyarázó nem-genetikai tényezők (alkoholizmus vagy amlodipin gátlószer terápia). Továbbá, számos magas intermedier vagy emelkedett aktivitást, illetve mRNA expresszió mutató donor esetében CYP2B6 indukálószer terápia alkalmazására találtunk adatot. A *CYP2B6* genotípus alapján normál metabolizálónak (*CYP2B6**1/*1 vagy *CYP2B6**1/*5 genotípusú) minősített szövetdonoroknál magas intermedier fenotípust vártunk. Számos alacsony, illetve alacsony intermedier aktivitású/expressziójú 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. Az emelkedett CYP2B6 metabolizáló fenotípus kialakulását számos intermedier metabolizáló donor esetében magyarázta a metilprednizolon, midazolam vagy dexametazon terápia indukáló hatása. Habár az egy normál (*CYP2B6**1 vagy *CYP2B6**5) és egy emelkedett enzimaktivitást kódoló allélt (*CYP2B6**4 vagy *CYP2B6**22) hordozó donorok várhatóan a gyors metabolizáló csoportba tartoznak, emelkedett CYP2B6 fenotípussal kevés donor rendelkezett. Csupán egy magas intermedier fenotípusú donornál jegyezték fel a csökkent fenotípust magyarázó krónikus alkoholfogyasztást.

A *CYP2B6* genetikai variabilitás a szövetdonorok egyharmadánál magyarázta a kialakult CYP2B6 fenotípust. A donorok további egyharmadánál a donorok kórtörténetében feljegyzett nem-genetikai tényezők magyarázták a CYP2B6 fenotípus megváltozását. A

fennmaradó szövetdonorok esetében nem találtunk magyarázatot a genotípus alapján várttól eltérő CYP2B6 fenotípus kialakulására (genotípus-fenotípus *mismatch*).

Többváltozós lineáris regressziós analízissel igazoltuk a *CYP2B6* g.15631G>T, valamint a g.18053A>G SNV-k, illetve csökkent aktivitással együtt járó *CYP2B6**6 allélt jelölő g.-82T/15631T/18053G/25505T haplotípus szignifikáns hatását a CYP2B6 fenotípusra. Továbbá, úgy találtuk, hogy mind az aktivitás/expresszió csökkenést, mind az emelkedést előidéző fenokonvertáló faktorok meghatározóak a CYP2B6 *S*-mefenitoin *N*-demetilációban, illetve mRNA expresszióban, melyek közül a legjelentősebbnek a CYP2B6-specifikus indukálószer terápia bizonyult. A donorok neme egyik modellben sem volt hatással a CYP2B6 fenotípusára.

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

A betegek CYP2B6 és CYP2C19 genotípusa

A ciklofoszfamid metabolizmusában meghatározó szerepet játszó CYP2B6 és a másodlagos CYP2C19 enzimek genetikai polimorfizmusait vizsgáltuk neuroblasztómával diagnosztizált betegek vérmintáinak felhasználásával; a *CYP2B6* és *CYP2C19* allélok relatív gyakorisága hasonló volt a kaukázusi populációkban megfigyelt előfordulási adatokhoz. A *CYP2B6* esetében a leggyakoribb allélok az enzimaktivitás csökkenéssel együtt járó *CYP2B6**6, illetve a fenotípust nem módosító *CYP2B6**5 voltak, míg a *CYP2C19* allélok közül csupán az enzimaktivitás kiesését *CYP2C19**2, illetve emelkedett enzimaktivitást okozó *CYP2C19**17 allél volt azonosítható. A betegek több mint fele normál/gyors CYP2B6 metabolizáló fenotípusúnak bizonyult, míg 40%-a a gyenge/közepes CYP2B6 metabolizálók közé tartozott. A normál CYP2C19 metabolizmus a betegek közel felénél volt várható, míg a betegek közel negyede gyenge/intermedier vagy gyors/ultragyors CYP2C19 metabolizáló képességű volt.

A ciklofoszfamid terápiát követő toxikus mellékhatások megjelenése neuroblasztóma betegeknél

A vizsgálatunkba bevont betegeknél hematológiai toxicitás alakult ki a leggyakrabban, mely minden beteget érintett. A vizsgált populációban a limfocita, illetve a neutrofil granulocita sejtpopulációk voltak a legérzékenyebbek (*grade 3* limfopénia, *grade 4*

neutropénia), illetve számos beteg esetében a trombociták, monociták, eozinofil granulociták és vörösvértestek száma is a referencia tartomány alsó határértéke alá csökkent. A második leggyakrabban előforduló mellékhatás a májfunkció romlás volt, bár jellemzően enyhe toxicitás volt megfigyelhető a májfunkciót jelző szérumszámok koncentrációja alapján (*grade 1/grade 2*). Az enyhe vesefunkció károsodást jelző emelkedett szérumszám kreatinin koncentráció (*grade 1*), illetve szérumszám nátrium és/vagy kálium koncentráció, valamint a húgyhólyag toxicitásának (haemorrhagiás cystitis) előfordulása sporadikus volt.

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

A betegek *CYP2B6* metabolizáló képessége szignifikánsan hozzájárult a ciklofoszfamid kezelést követő májkárosodás kialakulásához. A normál/gyors *CYP2B6* metabolizáló fenotípusú betegek több mint felénél figyeltünk meg kóros szérumszám GPT szint növekedést (60,0%). Többváltozós logisztikus regressziós analízissel megerősítettük, hogy a kóros szérumszám GPT szintek előfordulása szignifikánsan alacsonyabb volt a gyenge/intermediér *CYP2B6* metabolizálóknál, feltételezhetően a csökkent aktivitást okozó *CYP2B6**6 (g.-82T/15631T/18053G/25505T) allélvariáns jelenléte miatt. Bár a szintén májkárosodásra utaló kóros szérumszám GGT koncentráció előfordulása nem mutatott összefüggést a *CYP2B6* fenotípussal. Továbbá, szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni a *CYP2B6* metabolizáló fenotípus és a vesefunkció károsodás megjelenése között a szérumszám nátrium, kálium, valamint kreatinin szintek kóros emelkedése alapján. Azonban a húgyhólyag károsodására utaló véres vizelet tünet, valamint a vesetoxicitást jelző emelkedett szérumszám kreatinin koncentráció, csupán normál *CYP2B6* metabolizáló (*CYP2B6**1/*1 vagy *CYP2B6**1/*5 genotípusú) betegeknél jelentkezett.

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

A vér alakos elemek (limfocita, trombocita, neutrofil és eozinofil granulocita, monocita, valamint vörösvértest) számának csökkenése eltérő gyakorisággal fordult elő a gyenge/intermediér, valamint normál/gyors *CYP2B6* metabolizáló betegeknél. Nagymértékű (*grade 3*) limfopénia, illetve (*grade 3* és *grade 4*) trombocitopénia, valamint a monocita szám csökkenése ritkábban jelent meg a gyenge/intermediér

CYP2B6 metabolizálókénál összehasonlítva a normál/gyors CYP2B6 metabolizálókkal. A további sejtpopulációk (neutrofil és eozinofil granulociták, illetve vörösvértestek) számának csökkenése és a betegek CYP2B6 metabolizáló fenotípusa között nem mutattunk ki szignifikáns összefüggést.

A ciklofoszfamid tartalmú kezelés kimenetele a betegek *CYP2B6* és *CYP2C19* genotípusának függvényében

A különböző CYP2B6 vagy CYP2C19 metabolizáló képességű betegeknél azonos arányban fordultak elő a terápiára reagálók (teljes, vagy részleges remisszió kimenetelű betegek), illetve nem-reagálók (stabil, progrediáló betegség/elhalálozás kimenetelű betegek). Továbbá, többváltozós logisztikus regresszió értékelése során megállapítottuk, hogy a *CYP2B6* genetikai variabilitása nem mutatott összefüggést a betegek kemoterápiára adott válaszával, azonban a vizsgálat alapján a 1,5 év alatti betegek kedvezőbb terápia kimenetelre számíhattak idősebb társaikhoz képest, illetve a lányok kemoterápiára adott elsődleges tumorválasza kedvezőbb volt, mint a fiúké.

5 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 érzékenyebbnak bizonyultak a ciklofoszfamid toxikus hatásaira, míg a gyenge/intermediér 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 terápia.
- A neuroblasztómás 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.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 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

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

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