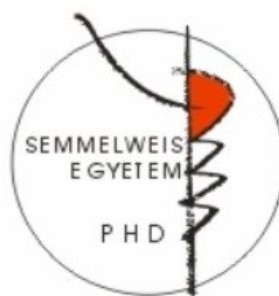


Molekuláris diagnosztikai módszerek klinikai jelentősége gyermekek egyénre szabott gyógyszeres kezelésében

Doktori tézisek

Dr. Búdi Tamás

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Garami Miklós, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Monostory Katalin, Ph.D. tud. főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Sipos Ildikó, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Jakus Rita, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Harsányi László, Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kálmán Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Liptai Zoltán, Ph.D., főorvos

Budapest
2016

1. Bevezetés

Magyarország gyermekpopulációjának kb. 1 %-a epilepsziás, az esetek jelentős része gyógyszeresen jól kezelhető. A gyermekkori epilepsziák egyik elsőként választható gyógyszere a valproát. A valproát mellékhatásai általában enyhék (testsúlynövekedés, hajhullás), azonban ritkán, de előfordulhat súlyos mellékhatás, úgymint hepatotoxicitás, pancreatitis, hyperammonaemiás encephalopathia, csontvelődepláció, ill. tartós kezelés esetén a csontok metabolikus zavarát is okozhatja.

Emberekben három fő metabolikus úton bomlik le a valproát: glükuronidáció, mitokondriális β -oxidáció, ill. citokróm P450-függő oxidáció. Az első két folyamat felnőttekben domináns, glükuronidációval ártalmatlanított vegyület akár 50 %-a is kiürülhet vizelettel, míg a mitokondriális folyamatok 30-40 %-ot ártalmatlanítanak. Felnőtteknél a CYP-dependens folyamatok a maradék kb. 10-20 %-ot teszik ki.

Gyermekeknél a CYP-katalizált folyamatok a fő metabolikus útvonalat jelentik. Ennek hátterében több folyamat is áll. Először is a glükuronidáció aktivitása igen alacsony gyermekeknél, különösen 2 éves kor alatt. Valproát glükuronidációját elsősorban a UGT1A6, UGT1A3, UGT2B7 enzimek katalizálják, melyek csak 2 éves kor után lesznek aktívak. A felnőttekére jellemző aktivitási maximumot csak 10-15 éves korra érik el. E mellett gyermekkori a valproát, ill. néhány valproát-metabolit gátolja a mitokondriális β -oxidációt. Ráadásul a CYP-enzimaktivitás jóval nagyobb gyermekkori, mely csak a pubertást követően csökken le a felnőttekre jellemző szintre. A fentiek eredőjeként a valproát-dózis sokkal nagyobb hányada kerül a CYP-enzimek "kezei közé", mely magyarázza a kisebb félélethetőséget, ill. a toxikus metabolitok képződésének nagyobb kockázatát.

A valproát lebontásában elsődlegesen a CYP2C9 működése meghatározó, azonban a CYP2A6 és a CYP2B6 enzimek is, kisebb súllyal, de részt vesznek. A *CYP2C9*-génnek számos allélvariációja ismert, melyek transzkripciójának/transzlációjának eredményeként csökkent működésű enzim képződik. E mutációk közül a kaukázusi populációban leggyakrabban a *CYP2C9*2* és *CYP2C9*3* lehetőségek fel.

Így gyermekeknél, a szinte kizárólagos CYP2C9-metabolizmus miatt a valproát szedése során igen súlyos, akár életet veszélyeztető toxicitás is felléphet, ha az enzimaktivitás valamilyen okból kifolyólag csökkent. Ehhez nagyban hozzájárul az, hogy a szer terápiás és toxikus vérszintje között viszonylag kicsi a különbség, emellett a testsúlyra vonatkoztatott dózisok igen nagy egyéni különbséget mutathatnak a különböző korosztályokban.

A gyógyszerlebontási-képesség egyéni különbségeiért leginkább a CYP - enzimek genetikai polimorfizmusa felelős. Néhány CYP-gén (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5*)

rendkívüli genetikai variabilitást mutat, ami különböző (csökkent avagy fokozott működésű) enzimvariációk létrejöttéért felelős. Farmakogenetikai polimorfizmusok alapján a népesség általában három nagy csoportra osztható: a gyenge metabolizálókra (poor metabolizer - PM), az átlagos (intermediér) metabolizálókra (IM) és a gyors (extenzív) metabolizálókra (EM).

A mutációt nem hordozó genotípus a működőképes enzim expressziójának a lehetőségét hordozza magában, azonban a genetikusan determinált enzimaktivitásokat átmenetileg modulálhatja számos változó; különböző endogén (életkor, hormonok, citokinek, májfunkció, betegségek) és exogén tényezők (táplálkozás, gyógyszerek, mérgek) különböző génexpressziót eredményezhetnek, és átmenetileg eltérő gyógyszermetabolizáló - képesség kialakulásához vezetnek.

Egy olyan egyén, aki funkcióvesztő mutációt hordozó allélokkal született, csökkent működésű vagy teljesen funkcióképtelen enzimet termel, így nála állandó gyenge metabolizmusra számíthatunk (PM) az adott gyógyszerre nézve. Azoknál a betegeknél, akiknél génhiba nincsen (vagyis „vad” típusú allélokkal rendelkeznek, és normális funkciójú CYP-enzimet termelnek), átlagos (IM) metabolizmust várunk, azonban ebben a csoportban is kialakulhat átmeneti gyenge metabolizmus a gyenge génexpresszió (low expresser) következtében. Ennek oka az előbbieken részletezett exogén, ill. endogén hatásokban kereshető, melyek egyes CYP-gének expresszióját csökkenthetik (pl. egyes drogok, citrusfélék), így jóval alacsonyabb enzimszint alakulhat ki átmenetileg egy-egy enzimmél, míg mások teljesen megtartják működőképességüket. Ennek ellentéte is előfordulhat, a génexpresszió fokozásával (high expresser; pl. szteroidok, rifampicin ill. orbáncfű-tea hatására) átmeneti hyperexpresszió, ill. hypermetabolizmus is kialakulhat. Ezeket a folyamatokat, melyek a mutáció nélküli, várhatóan átlagosan metabolizáló egyének gyógyszerlebontó-képességét megváltoztatják, együttesen fenokonverciónak nevezzük. A fenokonverzió lehetőségével egyes betegségek során számolnunk kell, amelynek során kialakuló csökkent enzimaktivitás a toxicitás kialakulásának esélyét növelheti.

A gyógyszer-interakciók egy része az adott hatóanyag metabolizmusában résztvevő CYP-enzim működésének megváltozására vezethető vissza. A gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP-enzimek azonosításával, a gyógyszer-kölcsönhatások feltárásával számos mellékhatás kiküszöbölhető.

A farmakogenetikai vizsgálómódszerek a gyógyszerek hatását befolyásoló genetikai tényezők feltárásával foglalkoznak. Egy beteg gyógyszermetabolizáló - képességét elsősorban a genetikai háttér határozza meg. A mutációk fenotípus szinten (enzim funkció szinten) való megjelenése egyrészt csökkent működőképességű, inaktív, működésképtelen enzim kifejeződését, vagy akár az enzim teljes hiányát is eredményezheti (pl. *CYP2C9*2*,

*CYP2C19*2*, *CYP2D6*5*), másrészt a működőképes allél fokozott transzkripciójához is vezethet (pl. *CYP2C19*17*). Ennek következtében alakulnak ki a fentebb részletezett eltérő lebontóképességek (PM-IM-EM). Ehhez természetesen hozzájárulnak a már említett exogén-endogén hatások miatt létrejövő expressziós változások (CYP-enzim indukció/szuppresszió, gátlás) is. Mindezeket figyelembe kellene venni az ún. személyre szabott gyógyszeres terápia kidolgozása során. Feltérképezve az egyéni különbségeket a gyógyszer-hatékonyság és toxicitás terén, a páciens gyógyszerlebontó-képességéhez illeszkedő gyógyszeres terápia kialakításával elkerülhető a kedvezőtlen mellékhatások megjelenése.

Jelenleg a modern orvosi gyakorlat részeként elterjedőben van a személyre szabott gyógyszeres kezelés. Ehhez megbízható diagnosztikai háttér áll rendelkezésre a megváltozott enzim-működést eredményező mutációk kimutatására. Azonban a vizsgálatok csak a genetikai okokra visszavezethető megváltozott működőképességű CYP-enzimek meghatározására irányulnak - a páciens CYP genotípusának meghatározásával - így nem biztosítanak teljes információt az aktuális gyógyszerlebontó-kapacitásról olyan betegek esetében, akik nem rendelkeznek CYP mutációval.

Az egyes CYP-enzimek aktivitásainak (aktuális expresszióinak) hagyományos mérése májszövetet igényel, amely jelentős hátránynak tekinthető klinikai szempontból. Ráadásul az invazív májbiopszia (túbiopszia) esetében rendelkezésre álló szövet mennyisége nem elegendő a CYP-enzimaktivitások meghatározásához. A májban levő CYP mRNS szintek és az egyes enzimaktivitások közötti kapcsolatról ugyan már korábban is számos esetben beszámoltak, de a vér (ill. a vérből izolált leukociták) CYP-expressziós profilja és a máj gyógyszerlebontó-kapacitása közötti összefüggésekre Temesvári és munkatársai (2012) világítottak rá. Ugyanis a vérből izolálható fehérvérsejtek CYP expressziója tükrözi a máj CYP-aktivitását, így egyszerű vérvizsgálattal információt nyerhetünk a máj aktuális gyógyszerlebontó-képességéről.

Hogy pontosan meg tudjuk becsülni egy beteg aktuális gyógyszerlebontó-képességét, ismernünk kell a genotípust, és normál (vad) genotípusú egyéneknél az adott gén expresszióját is. E kétirányú megközelítést alkalmazó diagnosztikai rendszer, a CYPtestTM eredményei alapján lehetőség van a gyógyszeres terápia személyre szabott beállítására. A komplex diagnosztikai rendszer a beteg vérmintájának vizsgálatával lehetőséget biztosít a CYP-enzimdefektusok, vagy a jelentősen megnövekedett/lecsökkent CYP-expresszió meghatározására, amely rávilágíthat a gyógyszeres terápia módosításának szükségességére. A beteg életminőségét jelentősen javíthatja, ha az esetleges gyógyszer-metabolizmust érintő hiányosságokat még időben észleljük, és egyedi terápiát alakítunk ki az adott beteg számára.

2. Célkitűzések

A konvencionális valproát-adagolás szimptóma-függő, vagyis addig emeljük a dózist, ameddig elmúlnak a tünetek, és visszaveszünk az adagból, amennyiben mellékhatást észlelünk. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy molekuláris diagnosztikai módszer (CYPtestTM) segítségével - még a valproát-kezelés indítása előtt - megjósolható-e az egyéni valproát-szükséglet. Így elkerülhetnénk az aluldozírozást és a túladagolás okozta toxicitást, a kezelőorvosok, és nem utolsósorban a beteg gyermekek, ill. szüleik megalégedésére.

Ezek alapján alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Epilepsziás gyermekek esetében a *CYP2C9*-genotipizálás önmagában előre jelezheti-e a gyenge valproát-metabolizmust? Van-e jelentősége a *CYP2C9*-expressziónak?
- A magyarországi epilepsziás gyermekpopuláció *CYP2C9* genetikai polimorfizmusa hasonlít-e az európai fehér populációhoz?
- Epilepsziás gyermekek esetében van-e összefüggés a *CYP2C9*-státusz (*CYP2C9*-genotípus, *CYP2C9*-expresszió) és a valproát kialakult vérszintje között?
- *CYP2C9*-genotipizálás és *CYP2C9*-expresszió kombinációja előre jelezheti-e a szükséges céldózist?
- Klinikailag hatékony lehet-e a *CYP*-státusz alapú dozírozás?
- Ha igen, csökkenti-e a mellékhatások kialakulásának lehetőségét?

3. Vizsgálati módszerek

A célkitűzéseknek megfelelően két vizsgálatot terveztünk. Ez első vizsgálat során az epilepsziás gyermekek CYP2C9-genotípusának és CYP2C9-expressziójának feltérképezése mellett összefüggést kerestünk a betegek CYP2C9-státusza, és a valproát kialakult szérumszintje, illetőleg a terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózis között. A második vizsgálat során pedig arra kerestük a választ, hogy a valproát-kezelés indítása előtt feltérképezett CYP2C9-státusz, ill. az ez alapján tervezett gyógyszeres kezelés jelent-e előnyt az optimális vérszint elérésében, ill. csökkenthetők-e a gyógyszer mellékhatásai.

A vizsgálatokba a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinikáján, ill. a Heim Pál Gyermekkórház Madarász utcai részlegén kezelt 15 évesnél fiatalabb gyermekeket vontunk be. A gyermekek újonnan felismert epilepsziás betegek voltak, akik valproát monoterápiában részesültek. A vizsgálatok elvégzéséhez a Heim Pál Gyermekkórház Etikai Bizottsága (SZFG/2010/00167) ill. az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (13189-1/2011 ETT TUKEB) járult hozzá. A gyermekek szülei vagy törvényes képviselői részletes szóbeli, ill. írásbeli felvilágosításban részesültek, és a betegek csak a szülők/képviselők írásbeli hozzájárulását követően kerültek be a vizsgálatba.

Az I. klinikai vizsgálat

Az I. vizsgálat a betegek CYP2C9-státusza és a valproát vérszintje, valamint alkalmazott dózisa közti összefüggéseket tárta fel. A vizsgálatba 50, generalizált, ill. fokális epilepsziában szenvedő, valproátot szedő gyermeket vontunk be. Azokat a gyerekeket, akik az epilepszián kívül más betegségben is szenvedtek, ill. a valproáton kívül más gyógyszert is kaptak, vagy akiknél a valproát-kezelés időközben felfüggesztésre került, a vizsgálatból kizártuk.

A betegek demográfiai adatait, ill. az antikonvulzív kezelés részleteit rögzítettük. A csoportba 30 lány és 20 fiú került be, átlagéletkoruk 6,75 (0,5-15) év volt. Minden beteg a kaukázusi rasszba (európai fehér populációhoz) tartozott. A betegektől a valproát monoterápia megkezdése előtt vérmintát vettünk CYPtestTM elvégzése céljából, majd a szokásos klinikai protokoll alapján, a testtömeghez igazított céldózis fokozatos beállítása történt. A kezelést alacsony valproát adaggal (10-15 mg/kg) kezdtük, majd fokozatosan emelve, 5-10 nap alatt értük el a céldózist. A gyógyszeradagot a megfelelő klinikai válasz (rohammentesség) eléréséig emeltük (az adag egyes esetekben több vagy kevesebb is lehetett a tervezett céldózishoz képest); mellékhatás, ill. magas szérumszint észlelése esetén a dózist csökkentettük. A szérum valproát-szintjét a kezelés kezdetét követően kettő ill. négy hét elteltével ellenőriztük. A 4. héten mért gyógyszerszintet tekintettük a stabil steady-state

vérkoncentrációnak. A vérszint, ill. az aktuálisan adagolt valproát-mennyiség adatait, valamint a CYPtestTM vizsgálat eredményeit retrospektíve dolgoztuk fel.

A II. klinikai vizsgálat

A II. vizsgálatban összehasonlítottuk a klasszikus valproát terápiában, valamint a CYP2C9-státusz vezérelt terápiában részesülő betegek klinikai adatait, eredményeit. Ebbe a vizsgálatba 99 epilepsziás, 15 év alatti gyermek került be. A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akiknél valamilyen okból kifolyólag megszakításra került a valproát-kezelés. A retrospektív adatgyűjtés során a 2006 és a 2014 között újonnan diagnosztizált epilepsziás betegek adatát dolgoztuk fel. 2010 előtt (kontrollcsoport, 47 beteg) konvencionális, tünet-vezérelt valproát-kezelés történt, míg 2010-től kezdődően 52 beteg CYP2C9-státuszának felmérése (CYPtestTM) alapján történt meg a gyógyszerbeállítás (az I. klinikai vizsgálat eredményei szerint, a CYP-státusz alapján kalkuláltuk a megfelelő egyéni gyógyszeres szükségletet -ld. később). A CYPtest csoportba 28 lány és 24 fiú került be, átlagéletkoruk 6,25 év volt. A konvencionális kezelésben részesült kontrollcsoportba 16 lányt és 31 fiút válogattunk be, átlagéletkoruk 8 év volt.

A CYP-státusz alapján végzett gyógyszerbeállítás előtt, ill. ezt követően rendszeresen történt vérvétel a haematológiai (fehérvérsejt-, vörösvértest-, thrombocytaszám), ill. az egyéb biokémiai paraméterek (ALP, GOT, GPT, GGT, kalcium, foszfor) ellenőrzésére. A szérum valproát-szinteket kéthetente vizsgáltuk. Ammóniaszint meghatározás csak akkor történt, ha azt a tünetek indokolták. Minden, a kezeléssel kapcsolatos mellékhatást feljegyeztünk, ill. súlyos (hyperammonaemia, haematológiai eltérések, zavartság) és enyhe (aluszékonyság, fáradtság, enuresis, hajhullás) csoportba soroltuk azokat.

A CYPtest csoport betegei az I. vizsgálat megállapításai alapján kapták a gyógyszeres kezelésüket:

- Amennyiben két *CYP2C9* mutáns allél igazolódott, a valproát-kezelés indítását kontraindikáltuk, alternatív antiepileptikum alkalmazását javasoltuk.
- Egy mutáns allél esetében csökkentett gyógyszeradagot alkalmaztunk (10-20 mg/kg).
- Mutáció nélküli esetekben (*CYP2C9**1/*1) a gyógyszeradagolást az adott *CYP2C9*-expresszió várható gyógyszeres szükséglete alapján kalkuláltuk: normál expresszió esetén 30-40 mg/kg-ot, alacsony expresszió esetén 10-20 mg/kg-ot, míg magas expresszió esetén 40 mg-nál nagyobb céldózis adását irányoztuk elő.

A kontrollcsoport a standard klinikai protokoll alapján, testtömegre vonatkozóan kapta a kezelést, a céldózis 20-40 mg/kg volt.

A vérminták feldolgozása, valproátszint-mérés, CYPtest™ vizsgálat

A valproát vérszintjének meghatározásához a vért a reggeli gyógyszerbevételt megelőzően vettük le. Valproát-meghatározást kéthetente végeztünk, fluoreszcencia polarizációs immunoassay módszer segítségével (AxSYM Valproic Acid Assay, Abbott Laboratories, IL). A 2. heti mérés alapján, ha szükséges volt, módosítottunk a valproát adagolásán, azonban stabil vérszintnek a 4. heti eredményt tekintettük. Normál (terápiás) szérumszintnek a 40 és 100 µg/ml közötti értéket tekintettük.

A *CYP2C9*-genotipizálás és *CYP2C9*-expresszió meghatározása az MTA Természettudományi Kutatóközpontjában történt, ahová hűtve, a vérvételt követően 4 órán belül szállítottuk át a mintákat. Itt a vérmintákból fehérvérsejt, majd DNS-izolálást követően, meghatároztuk a betegek *CYP2C9*-genotípusát, továbbá a fehérvérsejtekből RNS-izolálást és mRNS mennyiségi meghatározást követően meghatároztuk a betegek *CYP2C9*-expresszióját. A *CYP2C9*-genotipizálásra "hydrolysis single-nucleotide-polymorphism analysis" módszerrel, TaqMan-próbák (BioSearch Technologies, Novato CA) felhasználásával került sor. A *CYP2C9*-expresszió meghatározására a leukocyták teljes RNS-tartalmát reverz-transzkripcióval, egyszálú cDNS-re írtuk át. Az így nyert cDNS-t real-time PCR módszerrel vizsgáltuk *CYP2C9* UPL-próba alkalmazásával (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A *CYP2C9* mRNS mennyiségét a standard "house-keeping" gén, a GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) szintjéhez viszonyítottuk.

A kapott értékek alapján a *CYP2C9*-expressziót Temesvári és munkatársai (2012) szerint három csoportba soroltuk: $5 \cdot 10^{-6}$ érték alatt alacsony expressziójú csoportba (low expresser); $2,5 \cdot 10^5$ felett magas expressziójú csoportba (high expresser); a két érték között pedig átlagos expressziójú csoportba (intermediate vagy normal expresser) kategorizáltuk a betegeket.

Statisztikai analízis

I. Vizsgálat

A valproát szérumszintjeit a dózissal, ill. testtömeggel normalizáltuk és $(\mu\text{g/ml}) \times (\text{dózis mg /tkg})^{-1}$ értékben fejeztük ki. A különböző *CYP2C9*-státuszhoz tartozó normalizált valproát-szinteket, és a terápiás vérszint (40-100 µg/ml) eléréséhez szükséges, ttkg-szerinti dózisokat meghatároztuk. A különböző *CYP2C9*-státuszú csoportok közötti különbségeket Kruskal-Wallis-, ill. Dunn-teszt segítségével határoztuk meg. Az eltéréseket a $P \leq 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

II. Vizsgálat

A valproát-szintek, a haematológiai-, ill. biokémiai paraméterek elemzése a GraphPad Instat (v3.05, GraphPad Software, San Diego, CA) szoftverrel történtek. A paraméterek eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel, a csoportok közötti összehasonlítást Mann-Whitney U-test segítségével végeztük. A CYP2C9-vezérelt kezelés előnyeit a klasszikus kezeléshez képest a terápiás tartományon belüli valproát-szintek, és hematológiai, biokémiai paraméterek összehasonlításával mértük fel. Szintén összehasonlítottuk a mellékhatások gyakoriságát. A két csoport közötti különbségeket Fischer-teszt segítségével értékeltük. Az eltéréseket a $P \leq 0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

A gyermekek CYP2C9-státusza

Az I. vizsgálat során 58 újonnan diagnosztizált epilepsziás gyermeknél (életkor < 15 év) meghatároztuk *CYP2C9* genetikai hátteret, és *CYP2C9*-expressziót. A betegek közel 30%-a polimorf *CYP2C9* allélt (*CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*) hordozott, azonban csak egy betegnél találtunk homozigóta mutáns genotípust (*CYP2C9*2/*2*). A betegnél a *CYP2C9* várható működésképtelensége miatt nem valproát-alapú antiepileptikum terápiát javasoltunk és a további vizsgálatokból kizártuk. A *CYP2C9*-expressziós vizsgálatok eredményei alapján megállapítottuk, hogy a betegek több mint a fele (56%) alacsony *CYP2C9*-expressziót mutatott és mindössze két betegnél detektáltunk magas *CYP2C9* mRNS szintet. Ez utóbbi két gyermeket a további vizsgálatokból ki kellett zárunk, mivel időközben a valproát hatástalansága – feltehetőleg a valproát fokozott metabolizmusa - miatt más antikonvulzív gyógyszer került beállításra. További öt beteget szintén kizártunk a vizsgálatból hiányos adatok, ill. nem valproát monoterápia indítása miatt. A fennmaradó 50 beteg közel egyharmadánál egy allélt érintő mutáció igazolódott (*CYP2C9*2* vagy *CYP2C9*3*). Az I. vizsgálatba beválasztott betegeknél a polimorf allél-gyakoriság (*CYP2C9*2* - 9%; *CYP2C9*3* - 6%) hasonló a kaukázusi populációra jellemző irodalmi adatokhoz (11 és 7 %).

A *CYP2C9*-génexpressziós vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a mutációval nem rendelkező betegek közel kétharmadánál alacsony expresszió volt kimutatható, és az alacsony *CYP2C9*-expresszálók aránya a teljes betegcsoportra vetítve is igen magasnak tekinthető (több, mint 50%). Ez különösen szokatlan, hiszen a gyermekeknél általában tapasztalható *CYP*-expresszió lényegesen magasabb a felnőttekhez képest. Temesvári és munkatársai (2012) által meghatározott *CYP2C9* alacsony expressziós cutoff érték ($<5 \cdot 10^{-6}$) a felnőtt, egészségesnek tekinthető populáció 25%-át minősíti alacsony expresszálónak.

A *CYP2C9*-státusz (genotípus és expresszió) alapján a betegcsoportot két fő kategóriára bontottunk - homozigóta vad *CYP2C9*1/*1* és heterozigóta *CYP2C9*1/mut* genotípusokra (*CYP2C9*1/*2* vagy *CYP2C9*1/*3*) -, melyeket további alcsoportokra osztottunk fel: alacsony (gyenge), átlagos (normál), ill. magas expresszálókra.

Bár azt gondolnánk, hogy a polimorf allélt nem hordozó betegek normális, átlagos gyógyszer-metabolizáló képességgel rendelkeznek, mégis a homozigóta “vad genotípusú” csoport mindössze 12 betege bizonyult átlagos gyógyszerlebontó-képességűnek. A *CYP2C9*1/mut* csoportban is megfigyelhető alacsony, ill. normál *CYP2C9*-expresszió. Ez nem meglepő, hiszen a mutáns allélek is átíródna mRNS-re és a csökkent funkciójú enzim is expresszálódik. A polimorf allél expresszióját is ugyanúgy befolyásolják a korábban már

említett endogén és környezeti hatások (pl. életkor, betegség, gyógyszeres terápia), mint a vad típusú allél átíródását. Azonban hiába látunk normál CYP2C9-expressziót a polimorf allélt hordozó betegeknél, fenotípusosan csökkent gyógyszer-metabolizmust várhatunk.

A betegek valproát-szintjei, ill. dózisszükségei

Az I. vizsgálatba bevont 50 gyermeknél a statisztikai analízis szignifikáns különbséget mutatott a különböző CYP2C9-státuszú betegek dózissal és testtömeggel normalizált szérumszintjei között. A normalizált szérumszintjei között a szignifikánsan alacsonyabbak voltak az átlagos enzimexpressziót mutató, homozigóta vad genotípusú (*CYP2C9*1/*1*) gyermekek esetében $(2,12 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1})$, mint alacsony expressziójú gyermekekénél $(5,13 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1})$. Szintén magasabb gyógyszerszintek alakultak ki a polimorf allélt hordozó betegeknél (*CYP2C9*2* vagy *CYP2C9*3*) esetén, akár normál expressziót $(4,33 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1})$, akár alacsony expressziót mutatott az illető beteg $(5,54 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1})$.

A homozigóta vad genotípusú (*CYP2C9*1/*1*) és alacsony génexpressziójú gyermekeket, illetőleg a polimorf allélt hordozó (*CYP2C9*1/mut*) betegeket összehasonlítva a *CYP2C9*1/*1* genotípusú, normál mértékben expresszáló csoporttal, 2-3-szor magasabb gyógyszerszintet észlelünk azonos mennyiségű gyógyszer bevitele mellett. Ha a polimorf alléllal rendelkező heterozigóta csoportokat az alacsony CYP2C9-expressziójú homozigóta vad *CYP2C9*-genotípusú betegeknél hasonlítjuk össze, a normalizált szérumszintekben szignifikáns különbség nem mutatkozik.

A jelenlegi antiepileptikus kezelés klinikai gyakorlata a "steady state" valproát szérumszintjét 40 és 100 $\mu\text{g/ml}$ között tartja optimálisnak. E terápiás tartományt a 30-40 mg/kg céldózis beállításával javasolt elérni. Megfigyelésünk szerint az alacsony expressziójú *CYP2C9*1/*1* genotípusú, ill. a mutációt hordozó heterozigóta (*CYP2C9*1/*2* vagy *CYP2C9*1/*3*) páciensek szignifikánsan alacsonyabb valproát-dózist igényeltek a terápiás vérszint eléréséhez, szemben a normál expressziójú homozigóta csoporttal.

A megfelelő szérumszint eléréséhez szükséges dózis hasonló az alacsony expressziójú homozigóta, ill. a heterozigóta csoportokban: *CYP2C9*1/*1* alacsony expresszálók esetében 17,8 mg/kg, *CYP2C9*1/mut* normál (átlagos) expresszálók esetén 16,7 mg/kg, míg *CYP2C9*1/mut* alacsony expresszálóknál 13,8 mg/kg valproát-dózis volt szükséges a terápiás vérszint eléréséhez. A normál expressziójú, homozigóta *CYP2C9*1/*1* genotípusú betegek esetében azonban már átlagosan 33 mg/kg-ra volt szükség. Ezek alapján a hagyományos, 30-40 mg/kg-os céldózis csupán a betegeink negyedének (24 %) volt megfelelő, azoknak, akik mutációval nem rendelkeztek és a CYP2C9-enzimet normál mértékben expresszálták.

Összességében tehát elmondható, hogy a CYP2C9-státusz befolyásolja a valproát szérumkoncentrációt, csakúgy, mint az optimális terápiás vérszint eléréséhez szükséges dózist epilepsziás gyermekek valproát monoterápiás kezelése során. Következésképpen az alacsony génexpresszió a valproát metabolizmusában (ill. a valproát dózisszükségletben és szérumszintekben) ugyanolyan hatást vált ki, mint a gyenge metabolizmust okozó mutáció. Emellett azonban a CYP2C9 polimorf allélt hordozó betegek esetén a valproát-lebontó képesség független a CYP2C9-expressziótól (CYP2C9*1/mut alacsony expresszálo, ill. CYP2C9*1/mut normál expresszálo csoportok között nincs szignifikáns különbség).

CYP-státusz alapján végzett gyógyszeres kezelés

A II. vizsgálat során a gyógyszeres kezelés indítása előtt a CYPtest csoportban (N=52) meghatároztuk a CYP2C9-genotípust, ill. CYP2C9-expressziót, és ez alapján állapítottuk meg a valproát céldózisát. A kontrollcsoportban a gyógyszeres kezelés beállítása, valamint a céldózis megállapítása konvencionális módon, testtömeg alapján történt. A CYPtestTM vizsgálat alapján egy betegnél észleltünk homozigóta (CYP2C9*2/*2) mutációt, emiatt a valproát-kezelést kontraindikáltuk. A gyermeket a további vizsgálatokból, ill. elemzésből kizártuk. Az előző vizsgálati adatokkal összehangban a polimorf allélt nem hordozó betegek 2/3-a gyengén expresszálta a CYP2C9-enzimet. Így összességében a CYP-szűrt csoportba tartozó betegek 74,5%-ánál alacsonyabb dózisu (10-20 mg/kg) kezelést irányoztunk elő, ellentétben a normál expressziót mutató betegekkel (30-40 mg/kg). Annak ellenére, hogy a kontrollcsoporthoz képest a CYP-szűrt betegek egy része jóval kevesebb gyógyszert kapott, a gyógyszer klinikai hatásában nem volt különbség, a két csoportban azonos rohamgyakoriságot észleltünk.

Bár a betegek 1 hónapos gyógyszereszedést követő stabil valproát-szintjei nem mutattak szignifikáns különbséget, a terápiás vérszinttől (40–100 µg/ml) való eltérés mértéke lényegesen különbözött a két csoportban (2,98 vs 21,2 µg/ml), sőt a terápiás vérszinttől való eltérés szignifikánsan ritkább volt a CYPtest csoportban (9/51 vs. 21/47).

A biokémiai ill. hematológiai paramétereket monitorizálva próbáltuk észlelni mindkét csoportban a mellékhatások kialakulásának első jeleit. A laborértékeket (májfunkciós paraméterek, kalcium, foszfor, fehérvérsejt, vörösvértest, thrombocyta) a gyógyszereszedés kezdetekor mért kiindulási szintekhez viszonyítottuk. A kiindulási laborértékek minden betegnél a normál tartományban voltak. Egy hónappal a terápia megkezdését követően mért hematológiai paraméterekben a csoportok között nem volt különbség. A biokémiai markerek közül egyedül az alkalikus foszfatáz szintjében volt eltérés. A kontrollcsoportban szignifikánsan magasabb alkalikus foszfatáz-szinteket észleltünk, mely akár hepatotoxicitásra,

akár csontanyagcsere-zavarra is utalhat. Mindemellett a transzamináz, a kalcium-, ill. foszforszintekben sem észleltünk különbséget a csoportok között. Az alkalikus foszfatáz szintje gyermekeknél az életkorral jelentősen változik, azonban az általunk észlelt, egy hónap alatt bekövetkezett változás inkább a valproát-kezelésnek tudható be, mintsem életkorból adódó enzimemelkedésnek, hiszen a betegek életkoreloszlása hasonló volt mindkét csoportban. Emelkedett szérumszintű alkalikus foszfatáz szinteket találtunk a kontroll betegek csaknem felénél, míg a CYPtest csoport betegeinek csupán 4 %-ánál észleltük emelkedett alkalikus foszfatáz értékeket.

Valproáthoz köthető súlyos mellékhatások kevésbé fordultak elő a CYPtest csoportban. A kontrollcsoport leggyakoribb (17%) súlyos mellékhatása a hyperammonaemia ($>50 \mu\text{mol/l}$, de $100 \mu\text{mol/l}$ is előfordult!) mindig magas alkalikus foszfatáz szintekkel ($>750 \text{U/l}$, de 1200U/l is előfordult!) társult, és a magas ammóniaszintek mellett aluszékonyság, fáradékonyság, eszméletvesztés, vagy viselkedészavar is kialakult. Az egyes mérsékelt mellékhatások tekintetében szignifikáns gyakoriságbeli különbség nem volt a két csoport között, bár az megjegyzendő, hogy az összes mérsékelt mellékhatás gyakoriságát tekintve szignifikáns különbséget találunk a két csoport között ($P=0,05$).

5. Következtetések

A valproát szérumkoncentrációját nagyban befolyásolja a beteg aktuális gyógyszerlebontó-képessége. Az adott pillanatban tapasztalható metabolizációs-képesség következménye a megfelelő terápiás válasz, vagy ennek elmaradása, ill. adott esetben a toxikus mellékhatások kialakulása is. Jelen tudásunk szerint a felnőtteknél nem a CYP2C9-mediálta metabolikus út az elsődleges a valproát lebontásában. Vizsgálatunkban igazolni tudtuk, hogy a 15 év alatti korosztályban a CYP2C9 kiemelkedő jelentőséggel bír a valproát metabolizmusában. A hagyományos dozírozással szemben a CYP2C9-genotipizálásnak van valamennyi jelentősége a valproát-kezelés indítása előtt, azonban kizárólag a genotípusra támaszkodó gyógyszerbeállítás során könnyen túldozírozhatjuk a beteget. A túldozírozás oka az lehet, hogy a valós gyógyszerlebontó-kapacitáshoz képest a genotípus alapján sokkal több normál metabolizmusú beteget várunk. A *CYP2C9*1/*1* genotípus ellenére észlelt gyenge metabolizmus oka az epilepsziás betegeknél a rohamok során felszabaduló citokinek okozta CYP2C9 'down-reguláció' miatt kialakuló CYP2C9-fenokonverzió. Ezért a gyerekek antiepileptikus kezelése előtt a genetikai- és nem genetikai faktorok eredőjeként kialakult aktuális CYP2C9-státusz feltérképezése kiemelkedő jelentőséggel bír.

A személyre szabott, CYP2C9-státusz vezérelte gyógyszeres kezelés epilepsziás gyermekek esetén segíti a megfelelő gyógyszerválasztást és a valproát céldózisának helyes meghatározását. Az ideális terápiás vérszint kialakulása csökkenti a toxikus mellékhatások (pl. hyperammonaemia, emelkedett alkalikus foszfatáz-szint) kialakulásának kockázatát. A személyre szabott gyógyszeres kezelés növeli a valproát alkalmazhatóságának biztonságát az egyik legsérülékenyebb betegcsoport, a gyermekek esetében.

A célkitűzésekben felvetett kérdéseinkre az alábbi válaszokat kaptuk vizsgálataink során:

- Epilepsziás gyermekek esetében a CYP2C9-genotipizálás önmagában csak a betegek 30 %-ánál jelzi előre a gyenge valproát-metabolizmust. A CYP2C9-enzim aktuális expressziójának ismerete kiemelkedő jelentőségű ebben a populációban. Kizárólag a CYP2C9-genotipizálás eredményére támaszkodva az aktuális gyógyszerlebontó-képesség túlbecsülhető.
- A magyarországi epilepsziás gyermekpopuláció CYP2C9 genetikai polimorfizmusa megegyezik az európai fehér populációban mért irodalmi adatokkal.
- Epilepsziás gyermekek esetében a CYP2C9 fenokonverziója igazolható, vagyis a mutációmentes (*CYP2C9*1/*1* genotípusú) betegek 2/3-ánál alacsony

enzimexpresszió mérhető, mely oka maga az epilepszia-betegség (ill. a rohamok során felszabaduló citokinek) lehet.

- Epilepsziás gyermekekben szoros korreláció figyelhető meg a CYP2C9-státusz, és a kialakult normalizált valproát vérszint között, mely egyben azt is bizonyítja, hogy a valproát metabolizmusának legfontosabb enzime gyermekkorban a CYP2C9.
- A CYP2C9-genotipizálás és CYP2C9-expresszió együttes értékelése előre jelezheti a megfelelő valproát dózisszükségletet.
- A CYP2C9-státusz vezérelt, egyénre szabott gyógyszeres kezelés klinikailag ugyanolyan hatékony, mint a hagyományos gyógyszerbeállítás (azonos rohammentesség).
- A CYP2C9-státusz alapján végzett gyógyszerbeállítás csökkenti a terápiás valproát vérszint-tartománytól jelentősen eltérő koncentrációk, valamint a valproát okozta mellékhatások kialakulásának kockázatát.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kötődő közlemények

Monostory K, **Búdi T**, Tóth K, Nagy A, Szever Z, Kiss Á, Temesvári M, Háfra E, Tapodi A, Garami M (2016): In response: Commentary on clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children. *Epilepsia* 57(8):1339-1340

IF: 4,571

Búdi T., Tóth K., Nagy A., Szever Zs., Kiss Á., Temesvári M., Háfra E., Garami M., Tapodi A., Monostory K. (2015) Clinical significance of CYP2C9-status guided valproic acid therapy in children *Epilepsia* 56(6):849-55

IF: 4,571

Tóth K.*, **Búdi T.***, Kiss Á., Temesvári M., Háfra E., Nagy A., Szever Zs., Monostory K. (2015) Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy *Personalized Medicine* 12(3):199-207

IF: 1,336

Nagy A*., **Búdi T.***, Temesvári M., Szever Zs, Szabó P.T., Monostory K. (2015) Adverse events in a newborn on valproate therapy due to loss-of-function mutations in CYP2C9 *Epilepsy & Behavior Case Reports* 4, p. 86–87

*: megosztott elsőszerzőség

Disszertációhoz nem kötődő közlemények

Sükösd Z., Jenővári Z., **Búdi T.** (2013) Single Incision Laparoscopic Surgery (SILS): új módszer a laparoszko-pos gyermeksebészet területén *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 18. évf. 3. sz., p. 101-103.

Búdi T., Kálmán A., Gyórfy Á, Székely E., Verebély T. (2009) Egy ritka betegség még ritkább lokalizációja: kétéves gyermek nyelőcsövéből kiinduló juvenilis fibrosarcoma *Gyermekgyógyászat*, 60. évf. 4. sz., p. 158-161.

Búdi T., Visy B., Fekete B., Farkas H. (2003) Angiotenzin konvertáló enzim inhibitorok és az angioödéma

Allergológia és Klinikai Immunológia, 6. évf. 2. sz., p. 71-76.

Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm a segítséget témavezetőimnek, Dr. Monostory Katalinnak és Dr. Garami Miklósnak. Szintén köszönöm Dr. Nagy Andrea és Dr. Szever Zsuzsanna segítő együttműködését, ill. a betegek vizsgálatba való bevonását. Szintén köszönet illeti Zentai Tímea áldozatos asszisztensi munkáját.

Nem utolsó sorban, nagyon köszönöm családom kitartását, támogatását, türelmét a cikkek, ill. a dolgozat írása alatt.