

# Molekuláris diagnosztikai módszerek klinikai jelentősége gyermekek egyénre szabott gyógyszeres kezelésében

Doktori értekezés

**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

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Bevezetés</b> .....	<b>4</b>
1.1. A xenobiotikumok biotranszformációja.....	6
1.1.1. A CYP-enzim szupercsalád .....	7
1.1.2. A CYP – metabolizmus egyéni különbségei, geno-fenotípus .....	8
1.1.3. Gyógyszerinterakciók, gátlás, indukció.....	9
1.1.4. Fenokonverzió klinikai jelentősége.....	12
1.1.5. Új molekuláris genetikai vizsgálómódszer: CYPtest™ .....	13
1.1.6. CYPtest™ a jelenlegi gyakorlatban.....	15
1.2. Az epilepszia.....	17
1.2.1. A gyermekkori epilepsziák típusai.....	19
1.2.2. Az epilepszia diagnosztikája és az ehhez szükséges eljárások .....	21
1.2.3. Az epilepszia kezelése .....	22
1.2.4. A valproát metabolizmusa.....	26
1.2.5. A valproát lebontásában részt vevő citokróm enzimek.....	30
<b>2. Célkitűzések</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Módszerek</b> .....	<b>32</b>
3.1. Az I. klinikai vizsgálat .....	32
3.2. A II. klinikai vizsgálat.....	33
3.3. A vérminták feldolgozása, valproátszint-mérés, CYPtest™.....	34
3.4. Valproát mennyiségi meghatározása .....	35
3.5. A CYP-expresszió meghatározása reverz transzkripció real- time PCR-rel .....	36
3.6. CYP-genotípus meghatározása hidrolízis SNP analízissel.....	37
3.7. Statisztikai analízis.....	38
<b>4. Eredmények</b> .....	<b>39</b>
4.1. A gyermekek CYP2C9-státusza .....	39
4.2. A betegek valproát-szintjei, ill. dózisszükségei.....	41
4.3. CYP-státusz alapján beállított gyógyszeres kezelés .....	44
4.4. Esetismertetés .....	49
<b>5. Megbeszélés</b> .....	<b>51</b>
5.1. Valproát-dózisigény a CYP2C9-státusz függvényében.....	52
5.2. A CYP2C9-státusz vezérelt valproát-terápia klinikai jelentősége.....	55
<b>6. Következtetések</b> .....	<b>57</b>
<b>7. Összefoglalás</b> .....	<b>59</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>60</b>
<b>9. Irodalomjegyzék</b> .....	<b>61</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke</b> .....	<b>72</b>
10.1. Disszertációhoz kötődő közlemények.....	72
10.2. Disszertációhoz nem kötődő közlemények.....	73
<b>11. Köszönetnyilvánítás</b> .....	<b>74</b>
<b>12. Függelék</b> .....	<b>75</b>
Ábrajegyzék.....	75
Táblázatok jegyzéke .....	76

## Rövidítések jegyzéke

ALP: alkalikus foszfatáz

cDNS: komplementer (complementary) dezoxiribonukleinsav

CYP: citokróm P450

EEG: elektroencephalogram

EM: gyors (extensive) metabolizáló

GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)

GAPDH: glicerálaldehyd 3-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GGT: gamma-glutamil transzferáz ( $\gamma$ GT)

GOT: glutamát-oxálacetát aminotranszferáz

GPT: glutamát-piruvát transzamináz

IM: átlagos (intermediér) metabolizáló

LC-MS: folyadékkromatográfia –tömegspektrometria (liquid chromatography–mass spectrometry)

mRNS: hírvivő (messenger) ribonukleinsav

NADPH: nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PM: gyenge (poor) metabolizáló

SNP: egy pontos nukleotid-polimorfizmus (single nucleotide polimorfizm)

UGT: uridin 5'-difoszfó (UDP)-glükuronoziltranszferáz (uridine 5'-diphospho glucuronosyltransferase)

UPL: Universal Probe Library

VPA valproát (valproic acid)

## 1. Bevezetés

A betegek gyógyszer-hatóanyagokra adott válasza nagymértékben eltér azonos dózisú hatóanyag alkalmazása mellett is. Ráadásul nemcsak az egyes betegek, hanem a gyermekek és a felnőttek gyógyszerre adott válasza között is markáns különbség mutatkozik. Ez az eltérés megmutatkozhat csökkent gyógyszerhatékonyságban, ill. ellenkezőleg, toxikus mellékhatások fokozott megjelenésében is. A különbség több tényezőnek is tulajdonítható, egyik legfontosabb a gyógyszerlebontásban szerepet játszó enzimek genetikai és expressziós variabilitása. A gyógyszer-metabolizmus legfontosabb helye a máj, azonban sok más szervben is történik biotranszformáció lényegesen kisebb intenzitással (tüdő, bélfal, vese, agy). A lipofil gyógyszer-vegyületek a metabolizmus során vízoldékonyabbá válnak, így könnyebben kiürülnek a vizelettel vagy az epével. A biotranszformáció első fázisú reakcióit elsődlegesen a citokróm P450 (CYP) családba tartozó enzimek katalizálják. A lebontás nagy egyedi különbségeit legfőképpen ezen enzimek genetikai variációi határozzák meg.

A molekuláris diagnosztikai módszerek, vagyis - más néven - a farmakogenetikai vizsgálatok célja kideríteni, hogy miért is hatnak különbözőképpen a gyógyszerek az egyes betegeknél, mi az oka a mellékhatás-profil és hatékonyság nagyfokú variációjának, és miért van az, hogy a sokaknál jól működő gyógyszerek egyes pácienseknél nem kellően, vagy egyáltalán nem hatékonyak, esetleg súlyos mellékhatásokat okoznak. Különösen olyan krónikus betegségek terápiájában van ennek jelentősége, amikor a beteg tartósan - akár egész életen át tartó - gyógyszeres kezelést kap. Ilyen tartós gyógyszeres kezelés a gyermekek antiepileptikus terápiája is.

A gyermekkori epilepsziák egyik elsőként választható gyógyszere a valproát. Felnőttekben e szer lebontása leginkább glükuronidáció (40%), ill. mitokondriális  $\beta$ -oxidáció (30-40%) útján történik, a CYP-enzimek csak kismértékben katalizálják a valproát metabolizmusát. Gyermekekben azonban, különösen a kicsiknél, a glükuronidáció nem működik, a  $\beta$ -oxidációt a tartós valproát-szedés gátolja, ennek megfelelően a CYP2C9-enzim működése kerül előtérbe. Ugyanakkor a CYP-enzimek expressziója gyermekekben lényegesen magasabb, mint felnőtteknél.

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 terápia és toxikus vérszintje között viszonylag kicsi a különbség, emellett a testsúlyra vonatkoztatott dózisok igen nagy egyéni különbséget mutathatnak a különböző korosztályokban.

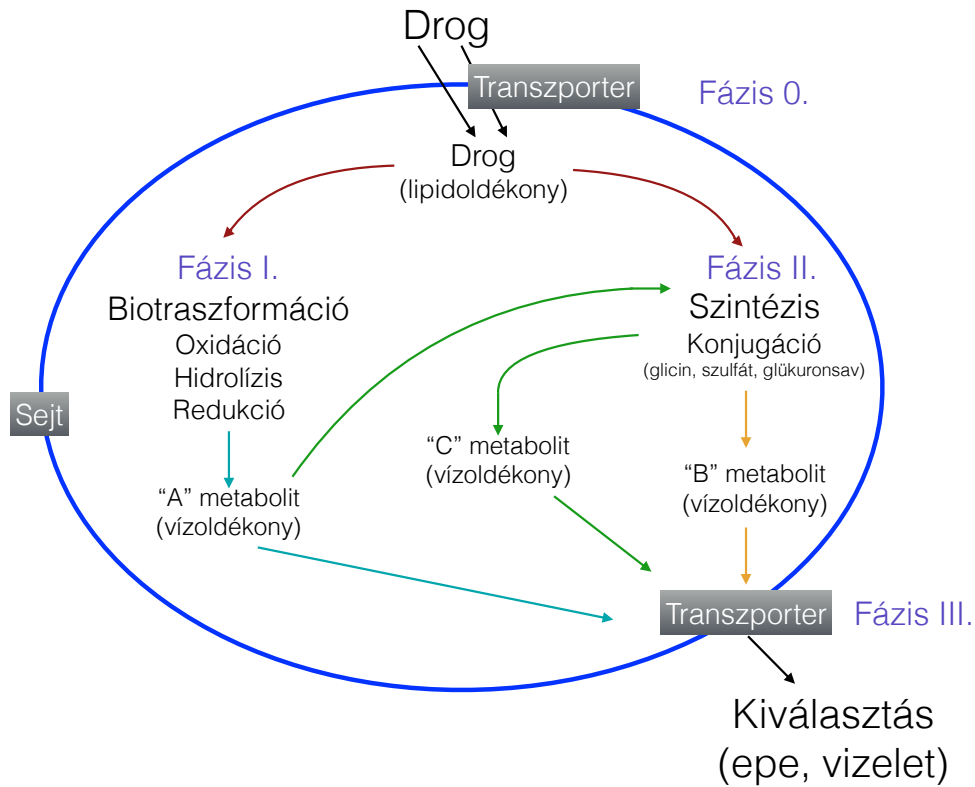
A konvencionális valproát-adagolás szimptóma-függő, vagyis addig emeljük a dózist, ameddig elmúlnak a tünetek, és visszaveszünk az adagból, amennyiben mellékhatást észlelünk. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy molekuláris diagnosztikai módszer segítségével - még a valproát-kezelés indítása előtt - 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.

### ***1.1. A xenobiotikumok biotranszformációja***

Az élő szervezetbe jelentős mennyiségű, változatos kémiai szerkezetű anyag kerülhet be, melyeket xenobiotikumoknak (testidegen anyagoknak) nevezünk. E vegyületek nagy része apoláros, ezért könnyen átjuthatnak a sejtmembránokon (fázis 0. folyamat). A biotranszformáció a testbe jutott idegen anyagok átalakítását, eliminálását jelenti, ami létfontosságú folyamat, hiszen a szervezetet az adott szer károsító hatásától megóvjaa (Handschin és Meyer, 2003).

A méregtelenítés során e vegyületekből poláris, hidrofil anyagok képződnek, melyek az epével, vizelettel könnyen kiválaszthatóak. A testidegen anyagok metabolizmusa két fázisra osztható: a fázis I. és fázis II. folyamatokra (1. ábra). Az I. fázisban elsősorban a monooxigenázok csoportjába tartozó CYP-enzimek vesznek részt. A gyógyszer-metabolizmusban résztvevő CYP izoenzimek aspecifikusak, több különböző szerkezetű szubsztrát átalakítását is végzik. Többnyire oxidálják a vegyületeket, azonban redukció és hidrolízis is előfordulhat (Ziegler és mtsai, 1994). Az első fázisban átalakult anyagok részben közvetlenül, részben konjugációt követően kiüríthetővé válnak a szervezetből. A fázis II. folyamatok során maguk a xenobiotikumok, valamint a fázis I. reakciók során képződött metabolitok különböző endogén vegyületekkel konjugálódnak. A konjugációs folyamatok során keletkezett vegyületek polaritása ill. vízben való oldékonysága növekszik, ami a szervezetből való kiüríthetőséget tovább fokozza (Jakoby és mtsai, 1994).

A xenobiotikumok eliminációjában transzporterek is részt vesznek. A transzporterek transzmembrán fehérjék, számos különféle kémiai szerkezetű anyag (pl. lipidek, szteroidok, gyógyszerek polipeptidek) szállítását végzik az extra- és intracelluláris membránokon keresztül. Ezeket nevezzük fázis III. folyamatoknak (Stieger és Meier, 1998; Suzuki és Sugiyama, 2000).



1. ábra. A biotranszformáció szakaszai (saját ábra)

### 1.1.1. A CYP-enzim szupercsalád

Omura és Sato 1962-ben írtak le egy különleges citokróm molekulát, melyet később „citokróm P450” enzimnek neveztek el. A P a pigment szó rövidítése, a hem-tartalomra, a szám pedig a redukált enzim szén-monoxiddal alkotott komplexének 450 nm-nél képzett jellegzetes abszorpciós maximumára utal (Omura és Sato, 1964). A CYP-enzimek hem tartalmú monooxigenázok, a hem-tiolát enzimesalád tagjai. A CYP-enzimek a molekuláris oxigénből származó egyik oxigénatomot építik be a szubsztrátba és ezzel párhuzamosan a másik oxigénatom vízkilépéssel távozik. A folyamathoz az elektronokat a NADPH-ról a NADPH-citokróm P450-reduktáz szállítja (Okita és mtsai, 1992).

A kutatások kezdetén csak egyetlen CYP-enzim létezését feltételezték, de később számos CYP formát azonosítottak, attól függően, hogy ezek szubsztrát-szelektivitása és bizonyos fizikokémiai sajátásaik mennyiben tértek el. Kiderült, hogy számos, különböző tulajdonsággal rendelkező CYP-enzim létezik az élő szervezetekben, jelenleg körülbelül 8000

CYP izoenzim ismert, az emberi genomonban 57 CYP-gén, valamint 58 pszeudogén van jelen (Zanger, 2013).

A CYP szuperfamilát az enzimek aminosav-sorrend homológiája alapján számos családra, ill. alcsaládra oszthatjuk. 40%-nál nagyobb aminosav-szekvencia egyezés esetén a CYP izoenzimek azonos családokba, 60%-nál nagyobb homológia esetén azonos alcsaládokba sorolhatóak (Lewis, 2001). Jelenleg 18 családot és 44 alcsaládot különböztetnek meg (Nelson, 2006).

A CYP betűjel utáni első arab szám jelöli az enzimes családot, a következő betű az alcsaládot, végül egy újabb szám jelöli magát a konkrét izoenzimet (pl.: CYP2C9).

A magasabb rendű állati szervezetekben legnagyobb mennyiségben a máj sima felszínű endoplazmás retikulumában, ill. a sejtmag és a mitokondrium membránjaiban expresszálódnak az enzimek. Kisebbségben megtalálhatók egyéb szervekben is, például az agyban, a vesében, a tüdőben, a lépben és a vékonybélben is (Waterman, 1992; Schenkman és Griem, 1993).

Egy adott CYP-enzim egy vegyületből több metabolitot is képes előállítani, ill. ugyanazon szubsztrát átalakítását különböző CYP-enzimek is végezhetik egyidejűleg (Porter és Coon, 1991; Juchau, 1990). Emberek esetében a gyógyszerek metabolizmusában főként a CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, CYP2C9 és CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1 izoenzimek vesznek részt.

### ***1.1.2. A CYP – metabolizmus egyéni különbségei, genotípus***

A gyógyszerlebontási-képesség egyéni különbségeiért leginkább a fenti enzimek genetikai polimorfizmusa felelős. Néhány CYP-gén (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A5*) rendkívüli genetikai variabilitást mutat, ami különböző (csökkent vagy fokozott működésű) enzimvariációk létrejöttéért felelős (Solus és mtsai, 2004). 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) (Ingelman-Sundberg, 2001).

A mutációt nem hordozó genotípus a működőképes enzim expressziójának a lehetőségét hordozza magában, azonban a genetikusan determinált enzimaktivitásokat átmenetileg modulálhatja számos változó; különböző endogén (kor, hormonok, citokinek,



májfunkció, betegségek) és exogén tényezők (táplálkozás, gyógyszerek, mérgek) különböző génexpressziót eredményezhetnek, és átmenetileg eltérő gyógyszermetabolizáló - képesség kialakulásához vezetnek (Monostory és Pascussi, 2008).

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.

Fokozott metabolizmus (EM) létrejöhet genetikus okok miatt is. A kaukázusi populációban pl. a CYP3A5 enzim egy igen elterjedt mutáció (*CYP3A5\*3*) következtében a legtöbb embernél működésképtelen. Mivel a CYP3A5 és a CYP3A4 enzimek szubsztrátjai igen hasonlóak, ha az adott egyén az átlagtól eltérően a működőképes *CYP3A5\*1* allélt hordozza, a májban a CYP3A5 enzim is működőképes lesz, így genetikusan determinált fokozott metabolizmusra lehet számítani a CYP3A szubsztrátok vonatkozásában (Monostory és Pascussi, 2008).

### **1.1.3. Gyógyszerinterakciók, gátlás, indukció**

A CYP-enzimek csökkent vagy fokozott expressziója jelentősen befolyásolja a xenobiotikumok sorsát a szervezetben, ill. a vegyület farmakológiai és toxikológiai sajátosságait. Ebből következik, hogy a gyógyszerfejlesztés és a gyógyszeres kezelés során egyaránt lényeges ismerni a gyógyszer, ill. a kezelésben alkalmazott egyéb szer CYP-indukáló és gátló tulajdonságait (1. táblázat). A CYP-enzimindukció többféle mechanizmussal valósulhat meg. Valódi indukciónak nevezzük, ha egy vegyület a nukleáris receptorokon keresztül fokozza valamely CYP-gén expresszióját, ami a CYP mRNS, továbbá az enzimfehérje mennyiségi növekedéséhez vezet. Az expresszió fokozásának másik

lehetséges mechanizmusa, ha a CYP mRNS, vagy az enzimfehérje életidejét valamely vegyület megnöveli, amely ugyancsak a CYP-enzim mennyiségi növekedéséhez vezet. Ez utóbbi hatást látszólagos indukciónak nevezzük (Monostory és Pascussi, 2008). Az enzimindukció általában késleltetett hatású, dóziszfüggő és az indukciós hatás lassan szűnik meg az induktor vegyület eliminálását követően (Handschin és Meyer, 2003).

A gyógyszer-interakciók egy része az adott hatóanyag metabolizmusában résztvevő CYP-enzim működésének gátlására vezethető vissza. A gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet játszó CYP-enzimek azonosításával, a gyógyszer-kölcsönhatások feltárásával számos mellékhatás kiküszöbölhető. A gátlás lehet reverzibilis (kompetitív és nem kompetitív), valamint irreverzibilis. A kompetitív reverzibilis gátlás esetében a gátló anyag a szubsztrát enzimhez való kötődését akadályozza meg, ilyenkor a szubsztrát és az inhibitor között versengés jön létre az enzimért (leggyakrabban az enzim aktív helyéért). A kompetitív inhibitor csökkenti az enzim-szubsztrát komplex kialakulását adott szubsztrátkoncentrációnál, azonban a szubsztrátkoncentrációt növelve az enzim-szubsztrát komplex mégis kialakul. A nem kompetitív reverzibilis gátlásnál a gátló anyag nem az enzim aktív centrumához, hanem valamely, a katalízisben szerepet játszó oldallánchoz kötődik, vagy egyéb módon (pl. az enzim konformációjának megváltoztatásával) akadályozza meg a katalízist. Az irreverzibilis gátlás során a gátlószer a gátló hatást az enzim irreverzibilis, gyakran kovalens átalakításával éri el.

**1. táblázat.** CYP-enzimek jelentősebb szubsztrátjai, inhibitorai és indukáló ágensei (forrás: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table/>)

<b>CYP - enzim</b>	<b>Szubsztrátok</b>	<b>Inhibítorok</b>	<b>Indukáló ágensek</b>
<b>CYP2C9</b>	diclofenac, ibuprofen, phenytoin, S-warfarin, tolbutamid, valproát, szulfametoxazol, trimetoprim	flukonazol, metronidazol	rifampicin, phenobarbital, orbáncfű-tea
<b>CYP2C19</b>	S-mephenitoin, R-warfarin, protonpumpa-gátlók, diazepam, imipramin	ticlopidin, ketokonazol, protonpumpa-gátlók, chloramphenicol	rifampicin, phenobarbital, szteroidok, orbáncfű-tea
<b>CYP3A4/5</b>	fentanyl, alfentanyl, lidocain, benzodiazepinek, szteroidok, makrolidok, daganatellenes szerek (vincristin, etoposid, irinotecan, cisplatin, doxorubicin) ciclosporin A, tacrolimus, carbamazepin, clonazepam, Ca-csatorna blokkolók, antihisztaminok, statinok	grapefruit, csillaggyümölcs, ketoconazol, fluconazol, norfloxacin, clarithromycin	rifampicin, barbiturát, carbamazepine, szteroidok, orbáncfű-tea
<b>CYP2D6</b>	β-blokkolók, antidepresszánsok, antipszichotikumok, lidocain, kodein	fluoxetin, kinidin	dexametazon
<b>CYP2E1</b>	isofluran, sevofluran, halotan	disulfiram	etanol

#### ***1.1.4. Fenokonverzió klinikai jelentősége***

A fenokonverzió definíció szerint azt jelenti, hogy a genetikusan determinált normál metabolizmus valamilyen okból kifolyólag megváltozik és a beteg gyenge (vagy ritkán fokozott) metabolizáló fenotípusú lesz. Ilyenkor, annak ellenére, hogy a genotípus változatlan marad, az enzimaktivitás illetve az expresszálódó enzimek mennyisége átmenetileg csökken. Ennek oka leggyakrabban társult betegség, vagy a szervezetbe került gyógyszer, esetleg táplálkozás során bejutó vegyület lehet. Meg kell említeni azt is, hogy az életkorral is változik a CYP enzimek expressziója. Az irodalmi adatok szerint, kisgyermekeknél lényegesen magasabb, mint a pubertás kor után, vagy mint a felnőtt korban mérhető érték, majd idős korban jelentős csökkenés következik be (Ginsberg és mtsai, 2002). Összességében mindezeket a folyamatokat, melyek a mutáció nélküli, várhatóan átlagosan metabolizáló egyének gyógyszerlebontó-képességét megváltoztatják, együttesen nevezzük fenokonverciónak (Shah és Smith, 2015-1).

A CYP-enzimeket kódoló gének szabályozásában és így az aktuális enzimkészlet kialakításában döntő szerepe van a szervezet homeosztázisának fenntartásában közreműködő endogén anyagoknak (hormonok, citokinek, interleukinek stb.), valamint az exogén vegyületeknek (gyógyszerek) is (Tang és mtsai, 2005). Ezen anyagok eredőjeként a CYP-gének transzkripciója változhat, mely végül emelkedett, vagy akár csökkent enzimszinteket eredményez (Waxman, 1999). Különböző betegségekben, gyulladásos folyamatokban számos immunmoduláns fehérje szabadul fel. Ezek közül a proinflammatorikus citokinek közül a legjelentősebb az IL-1, IL-6 és a TNF- $\alpha$ , melyek a májsejtek CYP enzimfehérje-expresszióját csökkentik. Ennek pontos mechanizmusa nem teljesen ismert minden esetben, egy biztos, hogy a citokinek a CYP enzimek transzkripciójában meghatározó szerepet játszó nukleáris receptorok (PXR, CAR) expresszióját gátolják. A folyamatok eredőjeként, többek között a gyógyszermetabolizáló-enzimek expressziója csökken, vagyis a CYP-enzimek „down-regulációja” zajlik (Aitken és mtsai, 2006).

Erre vonatkozólag számos *in vitro*, ill. *in vivo* bizonyíték gyűlt össze. Humán májsejtekben a CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 és a CYP3A4 expresszióját számos gyulladásos mediátor, többek között az IL-1, IL-6 és a TNF- $\alpha$  csökkentette (Aitken és Morgan, 2007). Anti-IL-6 monoklonális antitesttel pedig az IL-6 szuppressziós hatása a CYP3A4, ill. CYP1A2 enzimek esetén részlegesen kivédhető volt (Dickmann és mtsai, 2011). *In vivo* kísérletekben bakteriális endotoxinokkal, infekciókkal

(*Citrobacter rodentium*) váltottak ki gyulladási reakciókat. Ezek a vizsgálatok az *in vitro* kísérletekkel azonos eredményekre vezettek, vagyis az IL-1, IL-6 és a TNF- $\alpha$  szintjének emelkedése a CYP-enzimexpresszió csökkenéséhez vezet (Sanada és mtsai, 2011). Egészséges felnőtt önkénteseken végzett kísérletek bebizonyították, hogy bakteriális lipopoliszacharidokkal indukált enyhe gyulladási reakció is szignifikánsan csökkentette (átmenetileg) a CYP-mediálta gyógyszermetabolizmust (Shedlofsky és mtsai, 1994, 1997).

A gyógyszermetabolizmus változását írták le infekcióban (HIV, szepszis), illetve olyan nem fertőzőes eredetű gyulladási folyamatokban is, mint pl. májbetegség, daganatos betegségek, ill. reumatoid arthritis (Levy, 1997; Mayo és mtsai, 2010; Aitken és mtsai, 2006; Morgan és mtsai, 2008; Kruger és mtsai, 2009; Gandhi és mtsai, 2012). Ezek a közlemények elsősorban a CYP2C19, ill. a CYP2D6 „down-regulációjára” szolgálnak klinikai bizonyítékkal, azonban feltehetőleg a többi CYP-enzim is alacsony expressziójú lehet e betegségekben. Ráadásul a többi, citokin-emelkedéssel járó krónikus betegség (mint pl. diabetes, szívelégtelenség, epilepszia) jelenléte esetén feltehetőleg hasonló hatásokkal kell számolnunk, mely miatt a gyulladás-indukálta fenokonverzió valószínűleg jóval gyakoribb, mint ahogyan gondolnánk (Shah és Smith, 2015-2).

Így a jövőben a fenokonverzió lehetőségével számos krónikus betegség során számolnunk kell. Egyénre szabott gyógyszeres kezelés tervezésekor nem elegendő csupán a genetikai háttér (a beteg genotípusának) ismerete, számolnunk kell a krónikus betegségek enzimexpressziót hátrányosan befolyásoló hatásával, hiszen a csökkent enzimaktivitás a toxicitás kialakulásának esélyét növelheti.

### ***1.1.5. Új molekuláris genetikai vizsgálómódszer: CYPtest<sup>TM</sup>***

A farmakogenetikai vizsgálómódszerek a gyógyszerek hatását befolyásoló genetikai tényezők feltárásával foglalkoznak. Egy beteg gyógyszermetabolizáló - képességét elsősorban a genetikai háttér határozza meg. A populációban egy adott gén és az általa kódolt fehérje különböző változatokban lehet jelen. A polimorfizmus oka genetikai szinten lehet pontmutáció: (SNP -Single Nucleotide Polimorfism), amely egyetlen nukleotid eltérést jelent a vad és mutáns CYP gén között, de lehet inzerció, delécio, ill. duplikáció/multiplikáció (az

adott gén több kópiában való előfordulása) is. 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/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 kidolgozásával 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. Az elmúlt években a genetikusan determinált gyógyszerlebontó-képesség meghatározására irányuló farmakogenetikai vizsgálatok (ill. a szolgáltató cégek) száma jelentősen megnövekedett világszerte (Brockmöller és mtsai, 2000; Wilke és mtsai, 2005). Ezek a szolgáltatások csak genetikai okokra visszavezethető megváltozott működőképességű CYP-enzimek meghatározására irányulnak - a páciens CYP genotípusának meghatározásával - így nem biztosítanak teljes információt az aktuális gyógyszerlebontó-kapacitásról olyan betegeket esetében, akik nem rendelkeznek CYP mutációval.

Az egyes CYP-enzimek aktivitásainak hagyományos mérése májszövetet igényel, amely jelentős hátránynak tekinthető klinikai szempontból. Ráadásul az invazív májbiopszia (tübiopszia) 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 (Sumida és mtsai, 1999; Rodriguez-Antona és mtsai, 2001), de a vér (ill. a vérből izolált leukociták) CYP-expressziós profilja és a máj gyógyszerlebontó-kapacitása közötti összefüggésekre Temesvári és munkatársai világítottak rá (Temesvári és mtsai, 2012). Ugyanis a vérből izolálható fehérvérsejtek CYP expressziója tükrözi a máj CYP-aktivitását, így egyszerű vérvizsgálattal információt nyerhetünk a máj aktuális gyógyszerlebontó-képességéről. A leukocitákból történő CYP-expresszió meghatározása egy új tényezővel járul hozzá a piacon elérhető farmakogenetikai diagnosztikai eljárásokhoz.

Hogy pontosan meg tudjuk becsülni egy beteg aktuális gyógyszerlebontó-képességét, ismernünk kell a genotípust, és normál genotípusú egyénekben az adott gén expresszióját is. E kétirányú megközelítést alkalmazó, vérmintát felhasználó diagnosztikai rendszer, a CYPtest<sup>TM</sup> eredményei alapján lehetőség van a gyógyszeres terápia személyre szabott beállítására. A komplex diagnosztikai rendszer lehetőséget biztosít a CYP-enzimdefektusok vagy a jelentősen megnövekedett/lecsökkent CYP-expresszió meghatározására, amely rávilágíthat a gyógyszeres terápia módosításának szükségességére (Temesvári és mtsai, 2012). A beteg életminőségét jelentősen javíthatja, ha az esetleges gyógyszer-metabolizmust érintő hiányosságokat még időben észleljük, és egyedi terápiát dolgozunk ki az adott beteg számára. A CYPtest<sup>TM</sup> tehát kombinálja a CYP-genotipizálás és CYP-expresszió meghatározásának eszközeit a páciens gyógyszerlebontó-képességének feltérképezéséhez.

1. Első lépcsőben a klinikailag jelentős CYP-aktivitáscsökkenéssel járó mutáns CYP-allélek feltérképezése történik (genotipizálás).
2. Ezt követően megbecsüljük az aktuális CYP-expresszió szintjét azokban az esetekben, amikor vad típusú CYP-alléleket azonosítunk.

A két eredményt együttesen értékelve megbecsülhetjük a beteg aktuális gyógyszerlebontó-képességét. Ha ezeket az adatokat még a gyógyszer adagolása előtt megkaphatjuk, az nagyban hozzájárulhat a megfelelő terápiás sikerhez, ill. a toxicitás elkerüléséhez.

### ***1.1.6. CYPtest<sup>TM</sup> a jelenlegi gyakorlatban***

A CYPtest<sup>TM</sup>-et egyre szélesebb körben alkalmazzák a klinikumban Magyarországon. Gyakorlati jelentőségét egyre több intézmény ismeri fel. A legtöbb tapasztalat ez idáig a transzplantációk (máj, vese, szív, csontvelő) kapcsán gyűlt össze.

A transzplantált szervek kilökődésének megakadályozásában a legfontosabb immunmoduláns gyógyszerek a kalcineurin-gátló ciklosporin és takrolimusz. Hatékonyságuk ellenére e szerek szűk terápiás indexűek, ráadásul igen nagy egyéni variabilitást mutat a farmakokinetikájuk. Aluldozírás esetén megnő a rejekció esélye, míg túldozírás esetén vese- ill. májtoxicitással kell számolni. Ezek az immunszuppresszív gyógyszerek leginkább a CYP3A4, ill. CYP3A5 enzimeken metabolizálódnak. Az enzimaktivitás a genetikai variációk miatt, ill. enzimexpressziós okokból adódóan több mint százszoros különbséget is mutathat a populációban. A CYPtest<sup>TM</sup> alkalmazásával hatékonyan sikerült csökkenteni a kalcineurin-

gátlók alul- ill. túldozírozását, így a graft toxikus károsodása is megelőzhető a diagnosztikai módszer segítségével (Monostory és mtsai, 2015).

A képet árnyalja, hogy mind a donor, mind a recipiens szövetei különböző genetikai kódot hordozhatnak, melynek különösen májtranszplantációban van nagy jelentősége. Az immunmodulánsokon kívül a transzplantált betegek számos egyéb gyógyszert is kapnak, melyek egy része CYP-metabolizmusú (pl. antibiotikumok, antifungálius szerek, protonpumpa-gátlók). Ha olyan gyógyszert adunk a betegnek a posztoperatív szakban, melyet a transzplantált máj nem, vagy csak kis mértékben metabolizál, az a graft toxikus károsodásához vezethet. A recipiens és a donor CYP-státuszának felmérése, az egyénre szabott gyógyszeres kezelés beállítása hozzájárul a graft és a recipiens túléléshez, a súlyos gyógyszer mellékhatások esélye, és nem utolsósorban az egészségügyi ráfordítás is csökkenthető (Kóbori és mtsai, 2008).



## ***1.2. Az epilepszia***

Az epilepszia a viselkedés megváltozásával járó, kóros agyi működések okozta tünetegyüttes. A diagnózis kimondásához legalább két, egymástól független, nem provokált, lezajlott rohamra van szükség. Felnőttekben az agyi vérellátási zavarok után a második, gyermekeknél pedig a leggyakoribb ideggyógyászati kórkép. Krónikus betegség, sokszor az egész életen át tart, bár a gyerekkorban kialakuló epilepsziák egy része serdülőkorra eltűnhet. A betegség gyakorisága az összpopulációban átlagosan 0,3-0,6%, Magyarországon kb. 50-60.000 epilepsziás beteg él. A betegek 60-70%-a gyógyszeres terápiával rohammentesíthető, a farmakorezisztens betegek 10-15%-a pedig műtéti úton sikeresen gyógyítható (Halász és mtsai, 2004).

Az epilepszia incidenciája a legnagyobb az 1 év alatti korosztályban (Cowan, 2002). Az első életévben ez a gyakoriság számszerűen 1,5/1000-et jelent, mely fokozatosan lecsökken 0,6/1000-re az 5 - 9 év közötti korosztályban. Nagyobb gyerekekben ez az incidencia 0,45-0,5/1000 körül állandósul. Fejlett országokban a gyermekkori epilepszia összprevalenciája 4-5/1000 körül van, azonban fejletlenebb államokban ennek a duplája is előfordul (Forsgren, 2004). Magyarországon ez a szám a becslések szerint még ennél is nagyobb lehet, 1-1,5 % körüli prevalenciával (Fogarasi és mtsai, 2003).

Az epilepszia legjellemzőbb tünete az epilepsziás roham, vagyis az ingerületi folyamat elféktelenedése, melynek alapja az agyi működés hirtelen, átmeneti felerősödése, az izgalmi folyamatok fokozódása, ritkábban a gátló folyamatok csökkenése. Attól függően, hogy a létrejövő roham melyik agyterületet milyen mértékben érinti, többféle rohamtípust különböztethetünk meg. Ebből következik, hogy nemcsak a rohamok változatosak, hanem az egyes kórképek is jelentősen eltérhetnek a tünetek jellege, súlyossága, ezenkívül a prognózis és a terápiás lehetőségek szempontjából is.

Az epilepsziák alapvetően kétfélék lehetnek. Idiopathiás (20-25%), ill. symptomás (75-80%) csoportokat különíthetünk el. Az idiopathiás (primer) epilepsziás betegeknél általános, hogy az agyi elváltozás genetikai eredetű (mono- vagy poligénes), öröklődő. Agyi képzőanyag elváltozás kimutatható elváltozás nincs. Az eltérések molekuláris szinten észlelhetők, az idegsejtek ingerlékenységét szabályozó ioncsatornák vagy receptorok hibás működése, ill. a jelátvitelben vagy a sejtek anyagcseréjében bekövetkező kóros változások miatt. E kórképek jellegzetessége a generalizált elektroencephalogram (EEG)- minta, vagyis az epilepsziás működészavar kezdettől fogva az agy egészét érinti. Az idiopathiás csoportba

tartozó betegek általában jól kezelhetőek és az életkor előrehaladtával gyógyulnak. A másik nagyobb csoportba tartoznak a symptomás epilepsziák, ahol az agyat érintő veleszületett vagy szerzett struktúrális károsodások (trauma, agydaganat, gyulladás, fejlődési rendellenesség stb.) következtében alakul ki az epilepsziás működészavar. Az EEG eltérések focalisak vagy diffúzak lehetnek, ami azt jelenti, hogy az epilepsziás működészavar egyidejűleg az agy egy vagy több jól körülírt területét érinti, de bizonyos körülmények között az agy egész területére kiterjedhet. A klinikai tünetek bármely életkorban jelentkezhetnek, a kórlefolyás és a kezelhetőség széles határok között változhat (Edward, 2001; Szirmai, 2001).

Az epilepszia osztályozása számos szempont alapján történhet: a klinikai rohamtípus(ok), az életkor, melyben az első epilepsziás roham jelentkezik, az EEG-n látott eltérés, a neurológiai és mentális státusz, a képalkotó vizsgálatokon megfigyelhető eltérések. A tünetegyüttes osztályozása azért fontos, mert ezek figyelembevételével kell megválasztani a kezelés módját. A tünetek alapján az alábbi leggyakoribb rohamtípusokat különíthetjük el: tónusos-clonusos nagy roham (grand mal); absence rohamok (korábbi szóhasználattal petit mal – kis roham - „elrévedés”); parciális rohamok (az agy egy területe érintett); komplex parciális roham (tudatzavar is társul) (Szupera, 2004, Szirmai, 2001).

### ***1.2.1. A gyermekkori epilepsziák típusai***

Az 5. - 6. gesztációs héten indul meg a neuronok proliferációja, majd migrációja, amelyet a sejtek összekapcsolódása követ. Az ezt követő myelinizáció lassú folyamat, a születést követő egy évig tart. Bármelyik folyamat zavara epilepsziához vezethet. Kóros neuronproliferáció áll pl. a sclerosis tuberosás betegek epilepsziájának hátterében. A myelinfejlődés zavarának epileptogén hatása feltételezhető pl. a Lennox-Gastaut-szindrómában; szinaptikus zavarok pedig myoclonusos epilepsziát, mentális retardációt okozhatnak, mely megfigyelhető congenitális rubeolában, ill. a phenylketonuriában is. Egyes gyógyszerek, hormonok (szteroidok, barbiturátok) a sejtek proliferációját gátolhatják, míg pl. az alkohol a dendritkapcsolatok, ill. a szinaptikus hálózat kialakulásának gátlásával okozhat epilepsziát (Szirmai, 2001).

A fenti okok miatt a gyermekek epilepsziáinak jelentős része veleszületett, sokszor a háttérben álló konkrét okot kimutatni nem lehet (idiopathiás).

A leggyakoribb gyermekkori epilepszia típusok az alábbiak:

1. Benignus centrotemporális (parciális) epilepszia: A leggyakoribb, legjobb kimenetelű gyermekkori epilepszia. Legtöbbször 2-10 éves kor között kezdődik alvásból induló rohamokkal. Általában az arcizmokra terjed ki, féloldali száj- és nyelvzsibbadás, nyálfolyás, majd arc- és karrángás jelentkezhethet, mely grand mal típusú rohamba is átmehet. A rosszullétet átmeneti beszédzavar és az egyik szájzug lógása követheti. A prognózis jó, a rohamok 15 éves kor előtt általában megszűnnek.
2. Absence epilepsziák: Néhány másodpercig tartó, tudatzavarral, megrekedéssel, időnként ritmusos pislogással járó rohamokat észlelünk ebben az epilepszia formakörben. 4-10 éves kor között a leggyakoribb. Általában az első antiepileptikumra (valproát vagy ethosuximid) rohammentessé válnak a gyógyszer nélkül akár napi 100 rosszullétet is produkáló betegek. A kisgyermekkori forma kinőhető, a serdülőkorban induló juvenilis absence viszont legtöbbször egy életen át tartó gyógyszeres kezelést igényel.

3. Juvenilis myoclonusos epilepszia: Mioklonusos (izom megrándulós) és grand mal (eszméletvesztéses rángó nagyroham) rohamok jellemzőek ebben a genetikailag meghatározott epilepsziában. Serdülőknél, 12-16 éves kor között, a reggeli felkelést követő első órában jelentkeznek kisebb-nagyobb végtagrándulások. Típusos panasz, hogy a reggeli ital kilöttyen a csészéből, vagy a reggeli fogmosás közben nagyokat rándul a kéz. Gyógyszer szedése mellett rohammentessé válik a betegek jelentős része, de a gyógyszert életük végéig szedni kell. Újabb roham jellemzően bulik alatt vagy után jelentkezik, ahol az alvásmegvonás, az alkoholfogyasztás, az alkohol miatti gyógyszerkihagyás, ill. a diszkó villogó fénye egyszerre szerepelhet mint kiváltó tényező. Terápiarezisztens esetekben a gyermekek elbutulhatnak, vagy csökkent intelligencia alakul ki.
4. West szindróma: Tipikusan életkorfüggő forma, bármilyen agykárosodás, a néhány cm-es fejlődési rendellenességtől a nagy kiterjedésű oxigénhiányig vagy vérzésig bármi állhat a háttérben. A szindróma első tünete, hogy a csecsemő fejlődése 4-8 hónapos kor között leáll, majd spazmusokból álló rohamsorozat jelentkezik. A spazmus rövid összerándulások sorozatából áll, ami vállemelések, fejbiccentések sorozataként jelentkezik. 10-50 ilyen spazmus követi egymást néhány percen keresztül. Az életkor, a lelassuló fejlődés, az epilepsziás spazmusok és a típusos EEG-kép (ún. hypersarrhythmia) együtt adják a West szindróma diagnózisát. A terápia gyógyszeres, ritkábban sebészi. A gyógyszerrel általában le tudjuk állítani a rohamokat és rendezni az EEG-eltérést, de sajnos az agyi fejlődés igen aktív szakaszában induló epilepszia gyakran meglassult fejlődéssel jár.
5. Lennox-Gastaut szindróma: 2-7 éves korban indul új epilepsziaként vagy korábban másféle epilepsziás (pl. West szindrómás) betegekben. Lelassuló fejlődéssel, speciális EEG-képpel, tónusos és atóniás absence rohamok váltakoznak egymással. Gyógyszerekkel nehezen befolyásolható betegség. A kiváltó okot gyakran nem ismerjük (Szirmai, 2001; Fogarasi, 2015).

### ***1.2.2. Az epilepszia diagnosztikája és az ehhez szükséges eljárások***

A beteg kórtörténetének a görcs megítélésében rendkívül nagy jelentősége van, ezenkívül igen fontos magának a rohamnak a megfigyelése és leírása is. A diagnózis egyrészt egy EEG-vizsgálaton alapul. Az EEG-vizsgálat során a készülék az agykéregben keletkező parányi elektromos feszültségeket a fejbőrre helyezett elektródákkal elvezeti, felerősíti és korábban mozgó papírra, ma már a számítógép képernyőjére rajzolja ki. Az így felrajzolt görbék alapján elemezhető az agy elektromos működése. Az epilepszia diagnosztizálása során jellegzetes eltéréseket lehet ekkor megfigyelni mind a rohamok között, mind a rohamok alatt. A rohamtípusoktól függetlenül, a rohamokat követően a betegek 50 %-ában várható pozitív EEG-lelet. A rohamok közötti időszakban az epilepsziás jelek hiányozhatnak. Az epilepsziára jellemző jellegzetesen meredek hullámok utalnak a szomszédos idegsejtek nagy tömegének egyszerre történő működésbe lépésére, kóros szinkronitására. Ezek a jellegzetes eltérések azonban nem minden beteg esetében észlelhetőek, a vizsgálatok ismétlésével a kóros eltérések kimutatásának valószínűsége növelhető. Az ún. rutin EEG éber, csukott szemmel készített 15-20 perces felvétel, melynek során a beteget 3 percen át terhelésnek tesszük ki, hiperventillál, ill. változó frekvenciájú fotostimulációt alkalmazunk. Kétség esetén a vizsgálat megismételhető, de két-három negatív eredmény után már nem érdemes ismételni. További információt adhat az alvás alatti EEG vizsgálat, amely lehet az alvás megvonás utáni rövid alvás vizsgálata, vagy teljes éjszakai természetes alvás vizsgálata, melynek során az agyi elektromos tevékenységet 12-24 órán át folyamatosan regisztrálják.

Az epilepsziák egyes formáit főként mágneses rezonanciás (MRI), ill. esetenként komputer tomográfias (CT) vizsgálattal kimutatható agyi károsodások okozzák. Ezért az MRI vizsgálat fontos diagnosztikai eljárás az epilepszia kórisméjének megállapításában.

Fontos rész az epilepszia kivizsgálásában a neuropszichológiai vizsgálat is, amely a szellemi tevékenység felmérésére irányul, és a beszéd, az emlékezet, ill. az agyi működések összehangolásának eltéréseit tudja kimutatni.

A diagnózis során nemcsak az epilepszia fennállását, hanem annak típusát is célszerű meghatározni, mert a későbbiekben ez fontos szerepet játszik a megfelelő, célzott gyógyszeres kezelés megválasztásában (Szirmai, 2001).

### ***1.2.3. Az epilepszia kezelése***

Az epilepszia ma már - az esetek többségében - kezelhető betegség. Legfontosabb kezelési módszere a folyamatos gyógyszeres terápia. A betegek több mint kétharmada a gyógyszeres kezeléssel rohammentesíthető, ilyen állapotban pedig az epilepsziával élők teljes értékű életet élhetnek. A gyógyszeres kezelés célja a mellékhatás nélküli rohammentesség, ill. az elérhető legjobb életminőség biztosítása a beteg számára.

Magáról a kórfolyamat kialakulásáról keveset tudunk, de valószínű, hogy heterogén úton jön létre. Az epilepsziás működészavar kialakulása (epileptogenezis) során egy krónikus izgalmi állapot fejlődik ki az idegrendszerben. Ez sokáig rejtve maradhat és csak akkor manifesztálódik epilepsziás roham formájában, ha ideiglenesen rövid időre felerősödik és az agy jelentős részére vagy akár egészére kiterjed. Az antiepileptikumok az epileptogenezis során kifejlődött kóros izgalmi állapotot csökkentik, ennek következtében gátolják a roham kialakulását (antikonvulzív hatás). Ez az antikonvulzív hatás valamely ioncsatorna forgalmának befolyásolásával jöhet létre, közvetlen vagy közvetett módon. Ezen mechanizmusok gátlása visszaszoríthatja a kóros izgalmi állapotot és így megakadályozhatja az epilepsziás roham kifejlődését. Hatásuk csak a roham visszaszorítására korlátozódik, a betegséget nem gyógyítják és kialakulását sem előzik meg (Löscher és Schmidt, 2002).

Az antiepileptikumok hatásmechanizmusa többféle lehet, ennek alapján négy főbb csoportba sorolhatóak (Michael és Löscher, 2004):

1. Feszültségfüggő ioncsatornák befolyásolása
2. Ligandfüggő ioncsatornák befolyásolása
3. Neurotranszmitterek szintézisének, felszabadulásának és/vagy visszavételének módosítása
4. Egyéb mechanizmusok

Az epilepszia hatékony gyógyszeres kezelése a XIX. század közepén kezdődött a bróm, ill. a bromidok alkalmazásával. Ezeket később számos új antiepileptikum követte. Napjainkig több mint negyven molekulát alkalmaztak az epilepszia terápiájában, jelenleg pedig körülbelül húsz jelentősebb vegyület van forgalomban. Az antiepileptikumokat többféleképpen is csoportosíthatjuk, szokás manapság az 1980-as évek végéig forgalomba került szereket első generációs vagy ún. "régiepileptikumoknak" nevezni, az ezeket követőket pedig második generációs vagy ún. "új epileptikumoknak". Ez a

megkülönböztetés azon a feltételezésen alapult, hogy az új szerek hatékonyabbak a régiéknél és kevesebb mellékhatásuk van, azonban ezeknek a kívánalmaknak nem felelt meg minden második generációs szer. A 2. táblázat a jelentősebb antiepileptikumokat és azok klinikai bevezetésének dátumát mutatja, ill. tartalmazza a vegyület kémiai nevét és a kémiai szerkezetéből adódó tulajdonságait is (Szupera, 2004).

**2. táblázat.** *Az antiepileptikumok klinikai bevezetése és a kémiai szerkezettel kapcsolatos tulajdonságuk (Szupera, 2004)*

Antiepileptikum	Kémiai szerkezet	Bevezetés éve	Kémiai szerkezettel kapcsolatos tulajdonság
Bromidok*	brómsó	1857	esszenciális anion, a szervezetben a kloridionhoz hasonlóan viselkedik
Phenobarbiturát	etil-fenilbarbitursav	1912	a barbiturátokhoz hasonló metabolizmus, szedatív és kognitív mellékhatások
Phenytoin	difenil-hidantoin	1937	a barbiturátokhoz hasonló heterociklikus gyűrű, de eltérő klinikai profil
Primidon	pirimidindion	1952	fő metabolitja a phenobarbiturát, így a barbiturátéhoz hasonló profil
Ethosuximid	szukcinimid analóg	1958	a barbiturátokhoz hasonló heterociklikus gyűrű, de egyedi klinikai profil
Sulthiam	szulfonilamid-származék	1963	a szulfátcsoport miatt karboanhidráz-gátló, nincs antibakteriális hatása
Karbamazepin	karboxamidazepin	1963	a triciklikus antidepresszánsokhoz hasonló szerkezet és tulajdonságok
Klonazepam	1,4-benzodiazepin	1963	a benzodiazepinekhez hasonló szerkezet és tulajdonságok
Valproát	2-propilpentánsav	1970	elágazó rövid szénláncú telített zsírsav

Klobazam	1,5-benzodiazepin	1978	csak a norklobazam metabolit aktív, a szedatív hatásra egy idő után tolerancia alakul ki (gyakran az antikonvulzív aktivitásra is)
Vigabatrin	$\gamma$ -vinyl GABA	1979	$\gamma$ -aminovajsav (GABA)-analóg, irreverzibilis agyi GABA-transzamináz-gátló
Oxkarbazepin	karbamazepin-ketoanalóg	1990	csak a monohidroxi-metabolit aktív, a karbamazepinhez hasonló klinikai profil, de tőle eltérő (kedvezőbb) farmakokinetikai tulajdonságok
Lamotrigin	feniltriazin-származék	1991	folsav-antimetabolit, de nem befolyásolja a folsav metabolizmusát
Zonisamid	szulfonamid-származék	1992	a szulfátcsoport miatt gyenge karboanhidráz-gátló is
Phelbamat	karbamoiloxi-fenilpropil-karbamát	1993	meprobamat-analóg, hasonló farmakokinetika, de nincs anxiolitikus hatása
Topiramát	fruktópiranóz-szulfamát	1996	fruktóz-analóg, a cukoranyagcserére nem hat, gyenge karboanhidráz-gátló
Gabapentin	ciklohexán-GABA	1997	GABA-analóg, de nincs közvetlen hatása a GABA-metabolizmusra
Tiagabin	nipekotinsav-származék	1997	GABA-transzporter enzim-gátló
Levetiracetam	pirrolidin-acetamid	2000	S-pirrolidin-derivátum, ismeretlen a hatásmechanizmusa
Pregabalin*	izobutil-GABA	2002	GABA-analóg, de nincs közvetlen hatása a GABA-metabolizmusra

\*Magyarországon jelenleg nincs törzskönyveztve



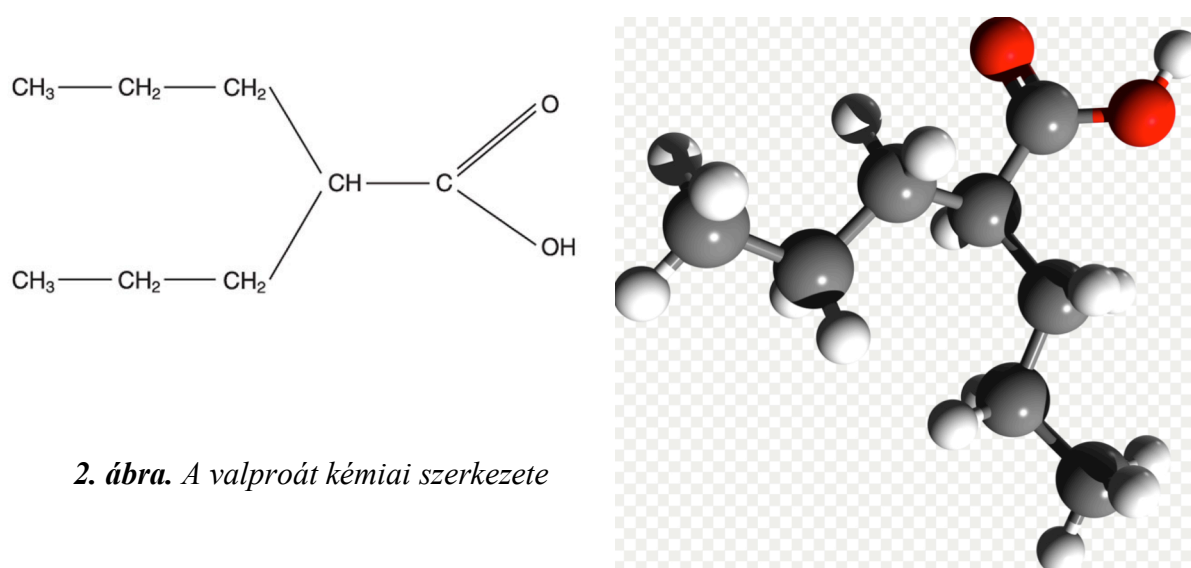
Az antiepileptikum beállítását egyénileg kell mérlegelni. Figyelembe kell venni a roham ismétlődésének kockázatát és a beteg szempontjait. Alapvető elvárás a monoterápiára való törekvés, mely a betegek 50%-ának rohammentességét eredményezi. Sikertelen monoterápia esetén gyógyszer-kombinációkat kell alkalmazni, ami az esetek többségében biterápia vagy olyan politerápia, ahol racionális gyógyszer-kombinációk adagolása a cél (Halász, 1997).

A jelenlegi kezelési gyakorlatban a régi antiepileptikumok az elsőként választandó szerek, így idiopathiás generalizált epilepsziában valproáttal, míg fokális, parciális epilepsziában karbamazepinnel kezdődik a kezelés. A benzodiazepinek (clonazepam, nitrazepam) mind generalizált, mind fokális epilepsziában adhatók, de használatukat mellékhatásaik (hypotonia, fokozott nyáelválasztás) korlátozzák. A diazepam tartós kezelésre nem használható. A régebbi szerek (phenobarbital, phenytoin, primidon) terápiaerezisztencia esetén jöhetnek szóba. A legújabb fejlesztésű szerek (lamotrigin, felbamat, gabapentin, oxkarbazepin, topiramát) hosszú távú hatékonyságáról és megbízhatóságáról ma még keveset tudunk, ezenkívül viszonylag drágák is, ezért használatuk szintén terápiaerezisztens esetekben merül fel. Vannak azonban olyan epilepszia-szindrómák, ahol az új szerek hatékonysága jóval felülmúlja a régi szerekét, ill. olyan helyzetek, amikor a gyógyszeres kezelés igen nagy rizikójú (májbetegség, terhesség, szoptatás stb.), így ilyen esetekben elsősorban ezek alkalmazhatóak. Amennyiben a gyógyszeres kezelés még két megfelelően megválasztott szerrel is eredménytelennek bizonyul, a műtéti megoldás lehetőségét is számba kell venni (Mattson, 1998; Halász, 1997).

A kiválasztott gyógyszer bevezetését kis dózissal érdemes kezdeni, majd adagja a megfelelő hatás eléréséig növelhető. Az alkalmazható maximális dózist elsősorban nem az antiepileptikum vérszintje, hanem a toxicitás klinikai és laboratóriumi jelei szabják meg. Fontos, hogy az antiepileptikum-váltás, -elhagyás és dóziscsökkentés egyaránt fokozatosan történjen. A vérszintmérés, vagyis a szérumkoncentráció meghatározásának azon gyógyszerek esetében van jelentősége, amelyek vérszintje szoros összefüggést mutat a terápiás hatással (pl.: karbamazepin, valproát, phenytoin, phenobarbital) (Halász, 1998).

### 1.2.4. A valproát metabolizmusa

A valproát (valproic acid - VPA) egy elágazó, rövid szénláncú zsírsav, a természetben (pl. a macskagyökérben) is előforduló valeriánsav származéka, mely az egyik leggyakrabban felírt antiepileptikum a gyermekellátásban. 1882-ben szintetizálta Beverly S. Burton valeriánsav-analógnaként. Inert anyag, sokáig oldószerként volt ismert, antiepileptikumként - egy véletlen felfedezés eredményeként - 1967 óta használt vegyület (Perucca E, 2002; 2. ábra).



2. ábra. A valproát kémiai szerkezete

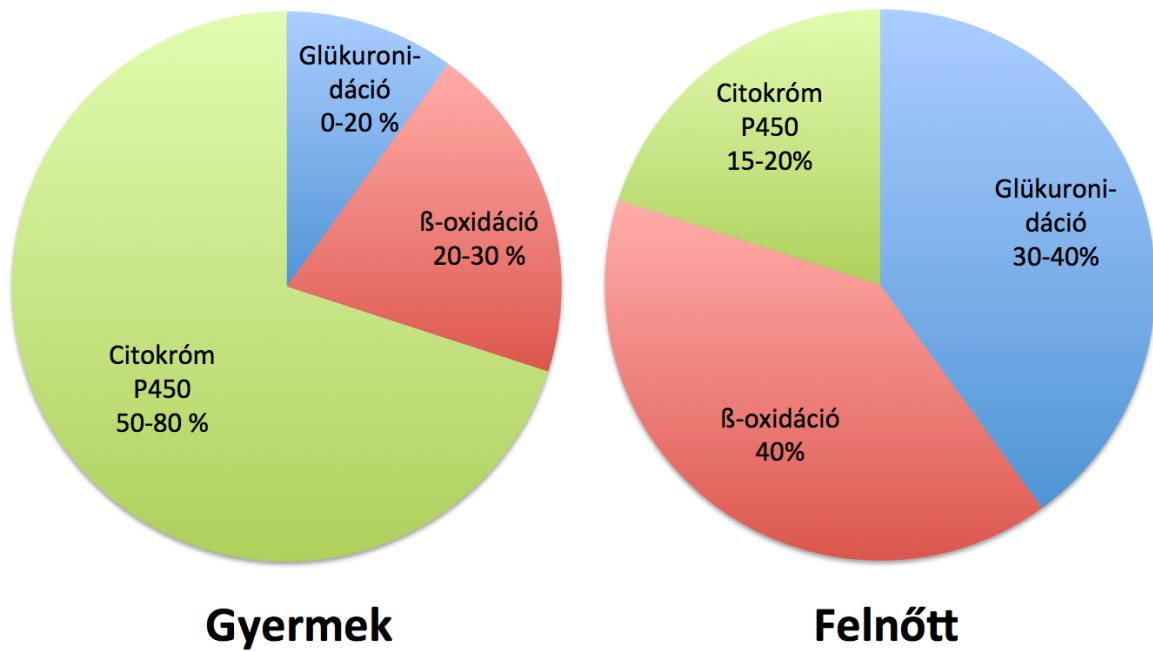
A valproát a GABA-hatást fokozza, valamint a serkentő transzmitterek és a feszültségfüggő nátrium-csatornák működését gátolja. Széles spektrumú antiepileptikum, gyermekeknél, generalizált epilepsziában az elsőként választandó. Antiepileptikus hatása mellett felhasználható extrapiramidális mozgászavarok, migrénes fejfájás, bipoláris zavarok és agresszív viselkedészavar kezelésére is. Előnye széles spektruma, emellett jól tolerálható, igen ritkán vált ki allergiás reakciót és hangulat-stabilizáló hatással is rendelkezik. Gyakoribb mellékhatásai 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 (Nanau és Neuman, 2013).

90%-ban plazmafehérjékhez kötődik, ezért gyakran lép interakcióba olyan gyógyszerekkel, amelyek szintén kötődnek a plazmafehérjékhez. Nem enziminduktor, a májban metabolizálódik, felezési ideje felnőtteknél 13-16 óra (Perucca és mtsai, 1978).

Gyermekeknél valamennyivel rövidebb a valproát féléletideje (átlagosan 11,6 óra - Cloyd és mtsai, 1993), mely magyarázatot adhat arra a tényre, hogy a gyerekek testsúlyra vetítve alkalmanként nagyobb dózisú gyógyszert igényelnek. Az újszülöttekben a felezési idő akár 20-40 óra is lehet (Gal P és mtsai, 1988).

Emberekben három fő metabolikus úton bomlik le a valproát: glükuronidáció, mitokondriális  $\beta$ -oxidáció, ill. citokróm P450- mediált oxidáció (3. ábra). 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 (Abott és Anari, 1999).

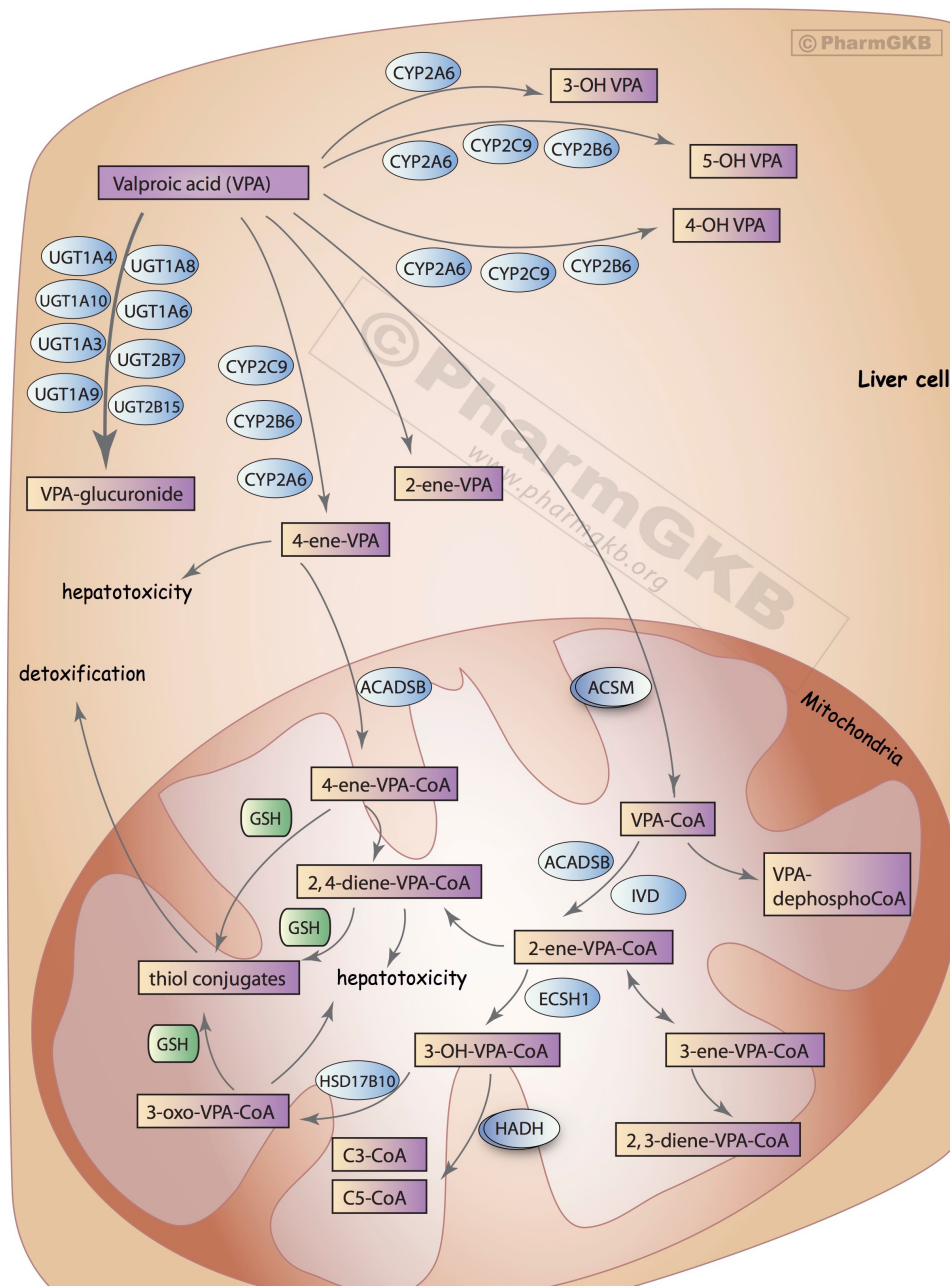
Gyermekeknél a CYP-katalizált folyamatok a fő metabolikus útvonalat jelentik. Ennek háttérében több folyamat is áll. Először is a glükuronidáció aktivitása igen alacsony gyermekeknél, különösen 2 év alatt. A valproát glükuronidációjában elsősorban a UGT1A6, UGT1A3, UGT2B7 enzimek vesznek részt (Sakaguchi és mtsai, 2004), melyek csak 2 éves kor után lesznek aktívak. A felnőttekére jellemző aktivitási maximumot csak 10-15 éves korra érik el (Strassburg és mtsai, 2002; Reith és mtsai, 2000). Emellett gyermekkorban a valproát, ill. néhány valproát-metabolit gátolja a mitokondriális  $\beta$ -oxidációt (Ponchaut és mtsai, 1992; Silva és mtsai, 2008). Ráadásul a CYP-enzimaktivitás jóval nagyobb gyermekkorban, mely csak a pubertást követően csökken le a felnőttekre jellemző szintre (Stewart és Hampton, 1987, Ginsberg és mtsai, 2002). A fentiek eredőjeként a valproát sokkal nagyobb hányada kerül a CYP-enzimek "kezei közé", mely magyarázza a kisebb féléletidőt, ill. a toxikus metabolitok képződésének nagyobb kockázatát.



**3. ábra.** A valproát lebontásában részt vevő enzimek aktivitásának életkori különbségei. Gyermekkorban a valproát eliminálásában a CYP-enzimeknek igen jelentős szerepük van.

A CYP-enzimek által katalizált folyamatban inaktív hidroximetabolitok, ill. hepatotoxikus valproát 4-én metabolit (4-ene VPA) képződik. Mitokondriális β-oxidációval jön létre a valproát 2-én metabolit, amely egy farmakológiailag aktív (antikonvulzív hatású) metabolit. Az agyban lassan felhalmozódik, és kiürülése sokkal lassabb, mint az anyavegyületé (Kiang és mtsai, 2006; Kumar és mtsai, 2000, Shorvon és mtsai, 2015). Valószínűleg ez adja a magyarázatot arra, hogy a valproát kialakult szérumszintje és az antiepileptikus hatás megjelenése között jelentős a különbség.

A metabolizmus igen szerteágazó (4. ábra) folyamatainak nem minden lépése ismert, és az sem, hogy pontosan hogyan alakul ki a hepatotoxicitás, ill. a hyperammonaemia, de feltehetően mind a valproátnak, mind a telítetlen metabolitoknak szerepük van benne (Siemes és mtsai, 1993). Egyes tanulmányok szerint ebben valószínűleg a legtoxikusabb metabolitok ártalmatlanításában részt vevő mitokondriális folyamatok kimerülése játszhat leginkább szerepet (Kassahun és mtsai, 1991, Ghodke-Puranik és mtsai, 2013).



#### 4. ábra. A valproát (VPA) lebontásában szerepet játszó folyamatok

(PharmGKB; <http://www.pharmgkb.org/pathway/PA165964265>; ACADSB: 2-methyl-branched chain acyl-CoA dehydrogenase; ACSM: medium-chain acyl-CoA synthase; IVD: isovaleryl-CoA dehydrogenase; ECSI1: enoyl-CoA hydratase; HADH: hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; HSD17B10: hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 10; GSH: glutathione)

### 1.2.5. A valproát lebontásában részt vevő citokróm enzimek

Az előzőekben részletezettek alapján, a gyermekeknél a valproát detoxikálásában a CYP-enzimeknek van kiemelkedő szerepük. A folyamatban elsődlegesen a CYP2C9 működése meghatározó, azonban a CYP2A6 és a CYP2B6 enzimek is, kisebb súllyal, de részt vesznek (Ho és mtsai 2003, Kiang és mtsai, 2006).

A gyermekek valproát metabolizmusában nélkülözhetetlen *CYP2C9*-génnek számos allélvariációja ismert, melyek transzkripciójának/transzlációjának eredményeként csökkent működésű enzim képződik. E variációk közül a kaukázusi populációban leggyakrabban a *CYP2C9\*2* és *CYP2C9\*3* lelhető fel (Zhou és mtsai, 2010). Ho és munkatársai írták le, hogy a valproát-metabolizmus sokkal alacsonyabb olyan májsejtekből izolált mikroszómákban, ahol a *CYP2C9\*2* vagy *CYP2C9\*3* mutáció fellelhető, ellentétben olyan mintákkal, ahol vad típusú (*CYP2C9\*1*), mutáció nélküli allél van jelen (Ho és mtsai, 2013).

A *CYP2C9\*2* (430C>T) mutáció egy arginin>cisztein aminosav cserét okoz a 144-es pozícióban (3. táblázat). Az Arg144-es aminosav fontos szerepet játszik a CYP2C9 és a NADPH-citokróm-P450 reduktáz közötti kölcsönhatás kialakításában. A *CYP2C9\*2* allél a CYP2C9-enzim csökkent affinitását eredményezi a NADPH-citokróm-P450 reduktázhoz, mert a bázikus aminosav-oldallánc cseréje miatt gyengül az enzimek között föllépő elektrosztatikus kölcsönhatás. Ezen aminosavcsere nem esik bele a szubsztrátfelismerő-helyek egyikébe sem, így a szubsztrátok kötődését nem befolyásolja, csak a NADPH-P450-reduktázhoz való csökkent affinitást eredményezi. A *CYP2C9\*3* mutáció (1075A>C) egy izoleucin>leucin cserét eredményez a 359-es aminosavnál (3. táblázat). Az aminosavcsere az ötös szubsztrát-felismerő helyen található, és jelentősen lecsökkenti a tolbutamid és phenytoin hidroxilációt, de a pl. a diclofenac hidroxilációt nem befolyásolja (Miners és Birkett, 1998; Lee és mtsai, 2002).

**3. táblázat.** Az európai fehér populációkban leggyakoribb *CYP2C9*-génvariációk és következményeinek összefoglalása. (<https://www.cypalleles.ki.se>)

CYP-enzim	Allél	cDNS	Gén	Poszt-transzkripció és fehérje szintű hatások	Enzimaktivitás
CYP2C9	*2	430C>T	Exon 3	R144C	redukált NADPH-citokróm P450 reduktázhoz való affinitás
	*3	1075A>C	Exon 7	I359L	szubsztrát specifitás változás

## 2. Célkitűzések

*CYP2C9* funkcióvesztő mutációval rendelkező betegeknél ugyan expresszálódik a *CYP2C9*, de hibás, csökkent működőképességű enzim termelődik, így az ilyen betegeknél lassú valproát-metabolizmus figyelhető meg. Kísérletes körülmények között egyértelműen bebizonyosodott, hogy már heterozigóta mutáció esetén is lecsökken a májsejtek valproát-metabolizmusa (Ho és mtsai, 2013).

A képet nagyban színesítheti, hogy a mutáció nélküli, “vad” alléllal rendelkező betegek környezeti hatások, betegségek kapcsán a fenotípus (génexpresszió) átmeneti megváltozása miatt átmenetileg gyenge, vagy akár extenzív metabolizálóká válhatnak (Monostory és Pascussi, 2008). Epilepszia esetében a rohamokat követően jelentősen megemelkedik az inflammatorikus citokinek mennyisége (Aitken és Morgan 2007; Yu és mtsai, 2012; Uludag és mtsai, 2013), mely anyagok felszaporodása a *CYP2C9*-expresszió csökkenéséhez, fenokonverzióhoz vezethet.

Ezek tudatában felmerül, hogy célszerű az epilepszia kezelésében rutinszerűen adott antiepileptikumok terápiás alkalmazása előtt a beteg *CYP2C9*-státuszának (*CYP2C9*-genotípus és *CYP2C9*-expresszió) feltérképezése és ez alapján az eddigi hagyományos gyógyszeres terápia észszerű módosítása.

A fentiek alapján az 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. 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. 2006-2010 között diagnosztizált betegek alkották a kontrollcsoportot, míg 2010 után, minden soron következő, még a valproát monoterápia beállítását megelőzően CYPtest<sup>TM</sup>-vizsgálaton átesett beteget bevontunk. 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.

#### 3.1. Az I. klinikai vizsgálat

Az I. vizsgálat a betegek CYP2C9-státusza és a valproát vérszintje, valamint alkalmazott dózisa közti összefüggéseket tárta fel (Tóth és mtsai, 2015).

A vizsgálatba 58, generalizált vagy fokális epilepsziában szenvedő, valproátot szedő gyermeket vontunk be. Társult betegséggel, vagy egyéb gyógyszer szedése mellett beteg a vizsgálatba nem kerülhetett be. A CYP-polimorfizmusra vonatkozó adatokat mindegyiküknél feldolgoztuk, azonban azokat a gyerekeket, akik a valproáton kívül végül más gyógyszert is kaptak, vagy akiknél a valproát-kezelés időközben felfüggesztésre került, vagy hiányos adataik voltak, a további vizsgálatból kizártuk.



A fennmaradó 50 beteg demográfiai adatait, ill. az antikonvulzív kezelés részleteit rögzítettük. A csoportba így 30 lány és 20 fiú került be, átlagéletkoruk 6,75 (0,5-15) év volt (4. táblázat). Minden beteg a kaukázusi rasszba (európai fehér populációhoz) tartozott. A betegektől a valproát monoterápia megkezdése előtt vérmintát vettünk CYPtest<sup>TM</sup> elvégzése céljából, majd a szokásos klinikai protokoll alapján, a testtömeghez igazított céldózis fokozatos beállítása történt (Guerrini, 2006). 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 gyógyszer szintet tekintettük a stabil steady-state vérkoncentrációnak. A vérszint, ill. az aktuálisan adagolt valproát-mennyiség adatait, valamint a CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálat eredményeit retrospektíve dolgoztuk fel.

### ***3.2. A II. klinikai vizsgálat***

A II. vizsgálatban összehasonlítottuk a klasszikus valproát-terápiában, valamint a CYP2C9-státusz vezérelt terápiában részesülő betegek klinikai adatait, eredményeit (Büdi és mtsai, 2015). 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 adatait dolgoztuk fel. 2010 előtt (kontrollcsoport, 47 beteg) konvencionális, tünet-vezérelt valproát-kezelés történt, míg 2010-től kezdődően 52 beteg CYP2C9-státuszának felmérése (CYPtest<sup>TM</sup>) alapján történt meg a gyógyszerbeállítás (az I. klinikai vizsgálat eredményei szerint, a CYP-státusz alapján kalkuláltuk a megfelelő egyéni gyógyszer 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 (5. táblázat).

A CYP-státusz alapján végzett gyógyszerbeállítás előtt, ill. ezt követően rendszeresen történt vérvétel a haematológiai (fehérvérsejt-, vörösvértest-, thrombocyta-szám), ill. az egyéb biokémiai paraméterek (ALP, GOT, GPT, GGT, kalcium, foszfor) ellenőrzésére. A szérum valproát-szinteket kéthetente vizsgáltuk. Ammóniaszint meghatározása 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 gyógyszeresükséglete 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.

### ***3.3. A vérminták feldolgozása, valproátszint-mérés, CYPtest<sup>TM</sup>***

A levett vérmintákból a biokémiai, haematológiai paraméterek, ill. a valproátszint-meghatározás az adott intézet helyi laboratóriumában történt (Heim Pál Kórház, ill. Semmelweis Egyetem).

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) szérum valproát-szintnek a 40 és 100 µg/ml közötti értéket tekintettük (Guerrini, 2006).

A *CYP2C9*-genotipizálás és *CYP2C9*-expresszió meghatározása az MTA Természettudományi Kutatóközpontjában történt, ahová hűtve, a vérvételt követően 4 órán belül szállítottuk át a levett 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 (Temesvári és mtsai, 2012). 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 szerint (Temesvári és mtsai, 2012) 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 / normal expresser) kategorizáltuk a betegeket.

### ***3.4. Valproát mennyiségi meghatározása***

Az AxSYM Valproic Acid Assay egy Fluoreszcens Polarizációs Immunoassay (FPIA), mely mérési módszer a fluoreszcencia jelenség sajátos vonásán alapszik. Ha a fluoreszcenciát egy oldatban síkban polarizált fénynyalábbal idézzük elő, akkor a fluoreszcens fény lehet továbbra is síkban polarizált, de el is veszítheti a polarizált jellegét. Ez annak függvénye, hogy a molekulák milyen gyorsan képesek forogni. Ha ugyanis a gerjesztés és a fénykibocsátás közötti időben a molekulák nem változtatják térhelyzetüket, akkor a kibocsátott fény polarizációs síkja megegyezik az elnyelt fényével. Ellenkező esetben a molekula elfordulásának megfelelően, más irányban lesz polarizált a kibocsátott fény. Mivel az egyes molekulák egymástól függetlenül forognak, a kibocsátott fény összességében már nem polarizált.

A molekulák forgási sebessége nagyban függ a méretüktől. A néhány százas moltömegű fluoreszcensen jelzett mintamolekulák olyan gyorsan forognak, hogy a fluoreszcens fény polarizációja eltűnik vagy nagyon lecsökken. Ha viszont egy ilyen molekula egy nagy fehérjéhez, pl. ellenanyaghoz kötődik, akkor az így létrejött komplex forgási sebessége olyan kicsi, hogy a fluoreszcens fény polarizált marad. Ha tehát a kis molekulájú fluoreszcensen jelzett antigén és a nagy molekulájú ellenanyag oldatát elegyítjük, és ezután mérjük a poláros fény által kiváltott fluoreszcencia polarizációs fokát, akkor azt tapasztaljuk, hogy a reakció időbeni előrehaladásával a polarizációs fok egyre nő. Ilyen módon követhető a reakció kinetikája is, majd az egyensúly beállása után a keletkezett

komplex mennyiségére is következtetni lehet. Adott mennyiségű ellenanyag alkalmazása esetén és kompetíciót alkalmazva, az egyensúlyi polarizációs fok és a fluoreszkáló anyag koncentrációja közti kalibrációs összefüggés mérhető.

A kompetitív eljárás során a mesterségesen jelzett antigén verseng a mérendő antigénnel az antitestek kötőhelyeiért, a jelzett antigén szabad ill. kötött formájának nem egyforma a jelintenzitása. Mivel ilyenkor a szabad és a kötött forma egyaránt ad jelet (eltérő intenzitással), ezért az ilyen módszerek viszonylag nagy koncentrációk mérésére alkalmasak (Horvai, egyetemi jegyzet).

### ***3.5. A CYP-expresszió meghatározása reverz transzkripció real-time PCR-rel***

A real-time PCR (RT-PCR) technika kifejlesztésével lehetővé vált az amplifikációs görbék felvétele, vagyis az amplikonok mennyiségének növekedése (relatív fluoreszcencia) ciklusról ciklusra nyomon követhető. A detektálás fluorimetriás úton történik. A PCR reakció exponenciális szakaszára igaz a  $2^n$  kinetika, mely szerint a termékek mennyisége minden ciklusban megduplázódik. Tehát, ha egy bizonyos fluoreszcencia értéket két különböző reakció egy ciklus különbséggel ér el, akkor az egyik reakcióban kétszer annyi kiindulási templát volt, mint a másikban.

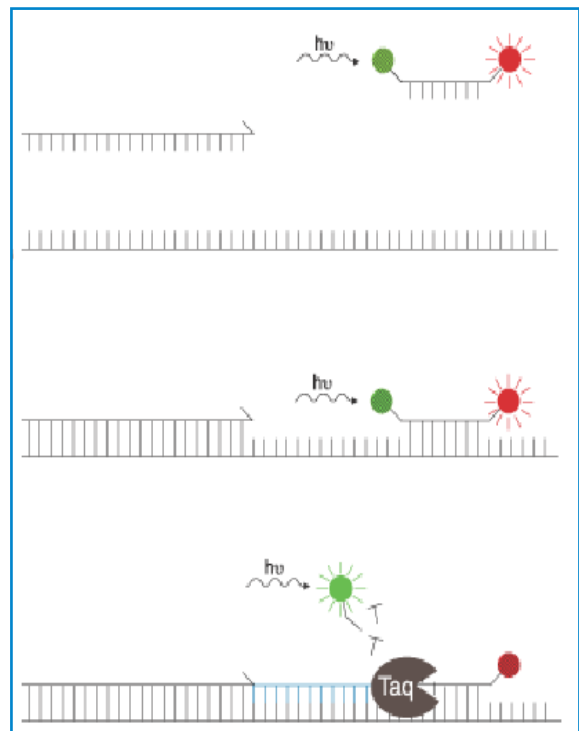
Mivel a PCR vizsgálat DNS-t használ templátként, az izolált RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-re írjuk át, és a RT-PCR során a cDNS relatív mennyiségét mérjük. A reverz transzkripció lineáris kinetikát követ, a keletkező cDNS mennyisége egyenesen arányos a kiindulási mRNS mennyiségével. A technikai pontatlanságból adódó hibák kiküszöbölésére a kiválasztott gén expresszióját egy belső standard, az ún. house-keeping gén expressziójához viszonyítjuk. House-keeping génként egy olyan gént választunk ki, melynek expresszióját sem a vizsgálat, sem egyéb környezeti hatások nem befolyásolják. Erre a célra mi a GAPDH-t használtunk. A ciklusonkénti relatív termékmennyiség meghatározására fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbákat használtunk.

A RT-PCR technikával minőségi információn kívül mennyiségi információhoz is juthatunk a vizsgálni kívánt nukleinsavat illetően. Az adott mérési rendszeren belül ezt az információt az áttörési pont ( $C_T$ ) adja meg. A  $C_T$  azt a ciklusszámot jelenti, ahol a fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd. Jelen esetben a mennyiségi meghatározáshoz komparatív  $C_T$  metodikát alkalmaztunk, amely az áttörési pontok közvetlen összehasonlítását teszi lehetővé. A módszer során a house-keeping gén és a vizsgált gén

átírása együtt történik, majd RT-PCR segítségével meghatározzuk az áttörési pontokat, melyekből relatív értékek kiszámításával következtethetünk az eredeti mennyiségre. A relatív expresszió mértékének meghatározásához kiszámítjuk a célgén és a house-keeping gén áttörési ciklusszámainak különbségét, majd az eredményt az exponenciális kinetikának megfelelően, kettő hatványaként helyettesítjük be.

### 3.6. CYP-genotípus meghatározása hidrolízis SNP analízissel

Az SNP (Single Nucleotide Polimorphism) analízist TaqMan próbák segítségével végeztük (Biosearch Technologies Novato, CA). Az eljárás során a PCR primerekén kívül a PCR mix-hez a mutációhoz specifikusan kötődő, fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotid próbákat (mutáns és vad típusú) adunk, amelyek a DNS amplikonon a mutáció környékére, egy belső rövidebb szakaszhoz kötődnek be (5. ábra). A mutáns és a vad próbák 5' vége (R=reporter) és 3' vége (Q=quencher) eltérő fluorofór festékekkel jelölt. A fluorofór festékek eltérő hullámhosszú fényt emittálnak, így lehet a későbbiekben a fluoreszcencia alapján különbséget tenni közöttük.



5. ábra. A PCR reakció lépései

A megfelelő próba a fragmentum belső szakaszához hibridizálódik, ekkor a két jelzés (reporter és quencher) közel van egymáshoz, így a reporter és a quencher között létrejön a Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) folyamata, vagyis a reporter által emittált fluoreszcens fényt a quencher képes elnyelni, így nem kapunk fluoreszcencia jelet. A templát amplifikációja során a próba 5' végével találkozó Taq polimeráz (5'>3' exonukleáz aktivitása révén) bázisról bázisra lebontja a próbát, a próba két végén levő festék ezáltal távol kerül egymástól, és a reporter jelzés emissziója detektálhatóvá válik.

Az allél diszkrimináció lényege, hogy a vad típusú, ill. a mutáns allélra tervezett specifikus TaqMan próbákat két eltérő fluoreszkáló festékkel jelöljük: FAM vagy CAL Fluor Gold 540 (vad típushoz); CAL Fluor Red 610 vagy Quasar 670 (mutáns típushoz). A mutáció helyére tervezett próbaszekvenciák középső része csak egy bázisban tér el. A vad típusú TaqMan próba kötődésének hatékonysága a mutáns allélhoz jóval alacsonyabb, mint a vad típusú allélhoz, a TaqMan próba és a célszekvencia között kialakult mismatch következtében. Ez fordítva is igaz: a mutáns típusú TaqMan próba jóval nagyobb hatékonysággal kötődik a mutáns allélhoz, mint a vad allélhoz. Homozigóta vad genotípus esetén csak a vad típusú próba ad fluoreszcens jelet, heterozigótánál a vad és a mutáns próba fluoreszcens jele együttesen észlelhető, míg homozigóta mutáns esetén csak a mutáns próba fluoreszcens jele jelenik meg.

### ***3.7. Statisztikai analízis***

#### *I. Vizsgálat*

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

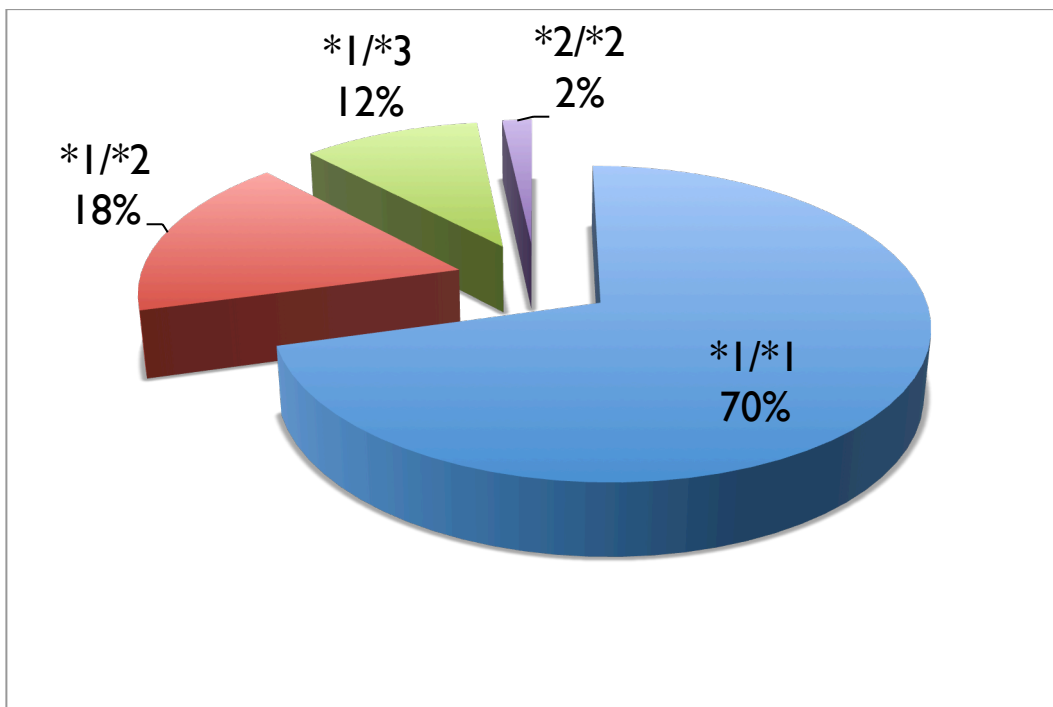
#### *II. Vizsgálat*

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.

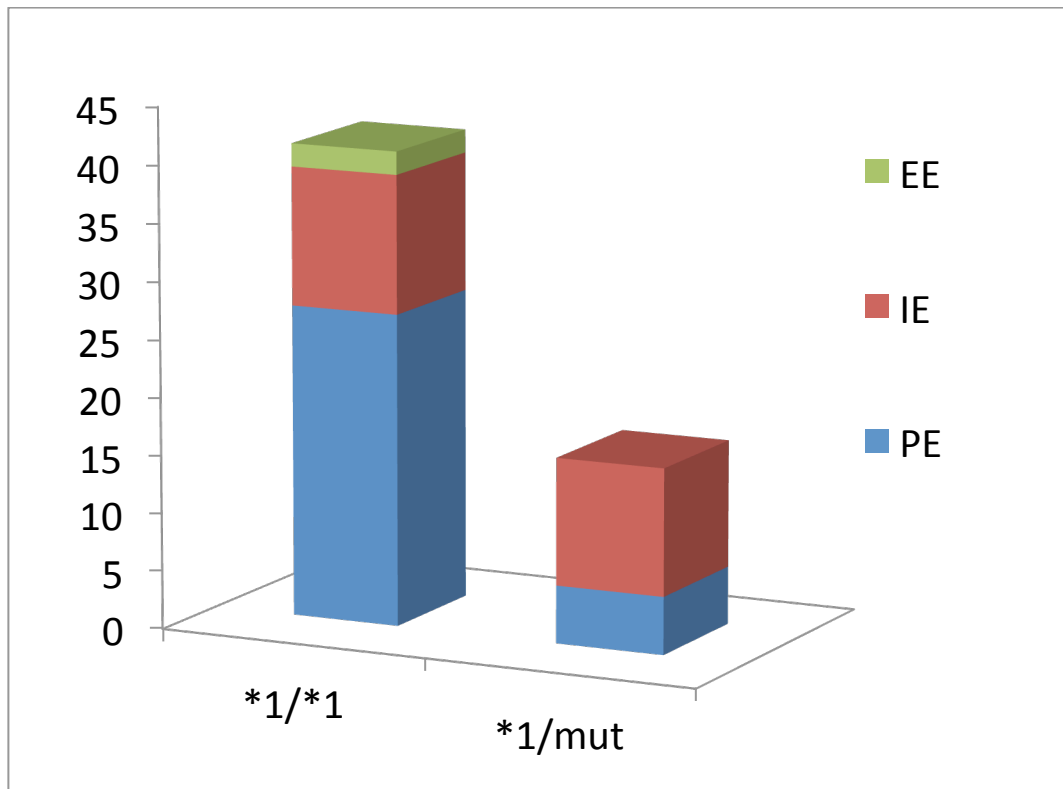
## 4. Eredmények

### 4.1. A gyermekek *CYP2C9*-státusza

Az I. vizsgálat során 58 újonnan diagnosztizált epilepsziás gyermeknél (életkor < 15 év) meghatároztuk a *CYP2C9* genetikai hátteret és a *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*) (6. ábra). 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 (7. ábra). 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 beállítása miatt. A fennmaradó 50 beteg közel egyharmadánál egy allélt érintő mutáció igazolódott (*CYP2C9\*2* vagy *CYP2C9\*3*) (4. táblázat). Az I. vizsgálatba beválasztott betegeknél a polimorf allélgyakoriság (*CYP2C9\*2* - 9%; *CYP2C9\*3* - 6%) hasonló a kaukázusi populációra jellemző irodalmi adatokhoz (11 és 7 % - Zanger és mtsai, 2008; Kurose és mtsai, 2012).



6. ábra. A betegek *CYP2C9*-genotípusainak megoszlása.



7. ábra. A betegek CYP2C9-expressziós adatai. (EE: magas expresszió, IE: átlagos expresszió, PE: alacsony expresszió)

4. táblázat. Az I. vizsgálatba beválasztott betegek CYP2C9-státusza, ill. demográfiai adataik

CYP2C9-státusz	Betegszám	Kor (évek) <sup>‡</sup>	Testsúly (kg) <sup>‡</sup>	Fiú/lány	
<i>CYP2C9*1/*1</i>	Átlagos expresszió	12	4 (0.5 – 15)	25 (6 – 60)	4/8
	Alacsony expresszió	23	7 (1.5 – 15)	27 (14 – 65)	10/13
<i>CYP2C9*1/mut</i>	Átlagos expresszió	11	4 (3 – 14)	19 (14 – 52)	5/6
	Alacsony expresszió	4	7.5 (4 -15)	22.5 (15 – 60)	1/3
Össz.	50	6.75 (0.5 – 15)	21.5 (6 – 65)	20/30	

<sup>‡</sup>: átlag (min; max); *CYP2C9\*1/mut*: *CYP2C9\*1/\*2* vagy *CYP2C9\*1/\*3*



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%) (4. táblázat). 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.

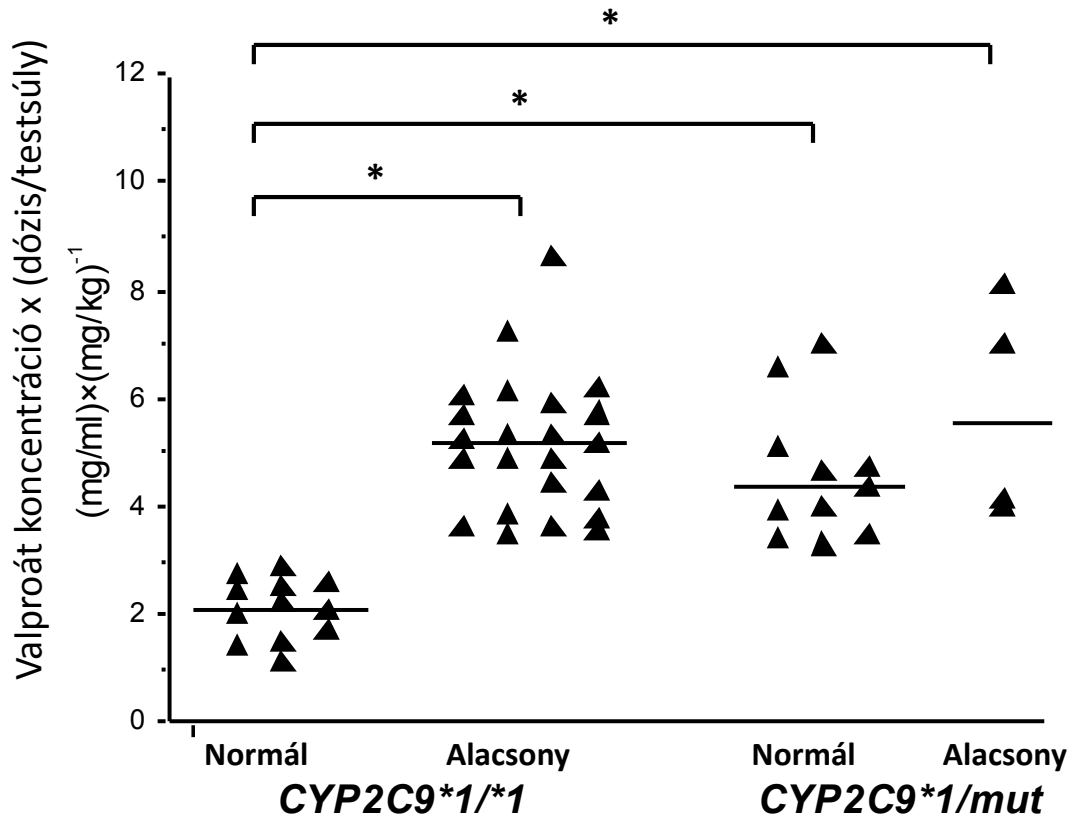
A CYP2C9-státusz (genotípus és expresszió) alapján a betegcsoportot két fő kategóriára bontottunk - homozigóta vad *CYP2C9\*1/\*1* és heterozigóta *CYP2C9\*1/mut* genotípusokra (*CYP2C9\*1/\*2* vagy *CYP2C9\*1/\*3*) -, melyeket további alcsoportra osztottunk fel: alacsony (gyenge), átlagos (normál), 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 4. táblázatból az is kiderül, hogy 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.

#### **4.2. 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 gyermekeknél ( $5,13 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1}$ ). Szintén magasabb gyógyszertartalmak 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 ( $5,54 \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times (\text{dózis mg/ttkg})^{-1}$ ) (8. ábra).

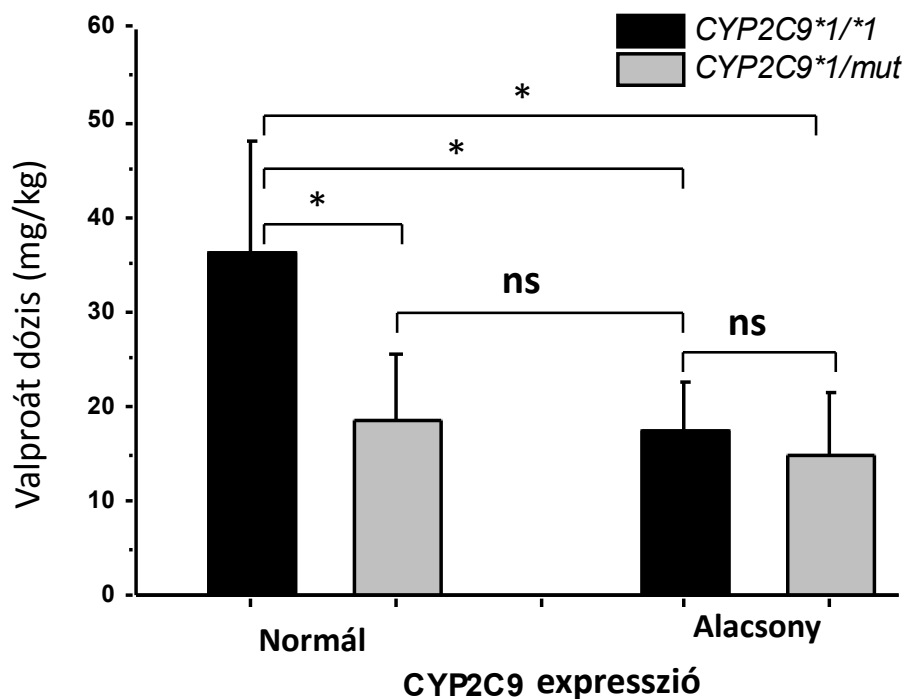


**8. ábra.** A normalizált valproát vérszintek a különböző *CYP2C9*-genotípusú (*CYP2C9\*1/\*1*, *CYP2C9\*1/mut*), ill. -expressziójú (alacsony, normál) betegeknél (\*: szignifikáns különbség a csoportok között,  $P \leq 0,05$ ).

Ha a homozigóta vad genotípusú (*CYP2C9\*1/\*1*), de alacsony génexpressziójú, illetőleg a polimorf allélt hordozó (*CYP2C9\*1/mut*) betegeket összehasonlítjuk a *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú, normál mértékben expresszáló csoporttal, 2-3-szor magasabb gyógyszer szintet észlelünk azonos mennyiségű gyógyszer bevétele mellett. Amennyiben a polimorf alléllal rendelkező heterozigóta csoportokat az alacsony *CYP2C9*-expressziójú homozigóta vad *CYP2C9*-genotípusú betegekkel hasonlítjuk össze, a normalizált szérumszintekben szignifikáns különbség nem mutatkozik.

A jelenlegi antiepileptikus kezelés klinikai gyakorlata a "steady state" valproát szérumszintet 40 és 100  $\mu\text{g/ml}$  között tartja optimálisnak. E terápiás tartományt a 30-40 mg/kg céldózis beállításával javasolt elérni (Guerrini 2006). 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 (9. ábra).



**9. ábra.** A valproát terápiás vérszintjének eléréséhez szükséges gyógyszeradagok a különböző *CYP2C9*-státuszú betegek esetében (ns: nem szignifikáns, \*: szignifikáns különbség a csoportok között,  $P \leq 0,05$ ).

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.

### **4.3. CYP-státusz alapján beállított 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 CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálat alapján egy betegnél észleltünk homozigóta (*CYP2C9*\*2/\*2) mutációt, emiatt a valproát-kezelést kontraindikáltuk. A gyermeket a további vizsgálatokból, ill. elemzésből kizártuk. A gyógyszeres kezelést megelőző *CYP2C9*-genotipizálás és *CYP2C9*-expresszió mérés eredményeit az 5. táblázatban gyűjtöttük össze. Hasonlóan az előző vizsgálatához, a gyermekek több, mint negyedénél észleltünk *CYP2C9*-génmutációt, a polimorf allélok előfordulási gyakorisága (*CYP2C9*\*2 : 6,75 %; *CYP2C9*\*3 : 5,75%) a kaukázusi populációra jellemző gyakorisági mutatóknak megfelel (Zhou és mtsai, 2010). Az előző vizsgálati adatokkal összhangban 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 (6. táblázat), azonban a terápiás vérszinttől (40–100 µg/ml) való eltérés mértéke lényegesen különbözött a két csoportban (2,98 vs 21,2 µg/ml) (10. ábra), sőt a terápiás vérszinttől való eltérés szignifikánsan ritkább volt a CYPtest csoportban (9/51 vs. 21/47; 6. táblázat).

5. táblázat. A II. vizsgálat betegeinek CYP2C9-státusz ill. demográfiai adatai.

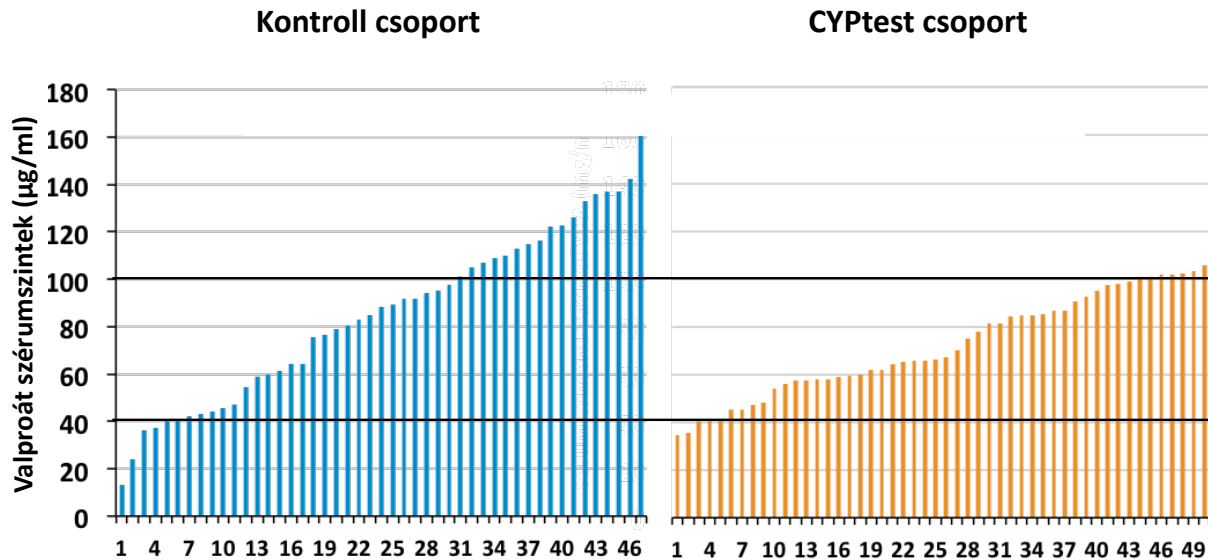
		Betegek	Kor (év) *	Testsúly (kg)*	Fiú/lány
<b>Kontroll-csoport</b>		47	8 (0.13 – 15)	27 (4.6 – 62)	31/16
<b>CYPtest csoport</b>		52	6.25 (0.5 – 15)	21 (6 – 67.5)	24/28
<i>CYP2C9*1/*1</i>	Normál expresszió	12	4 (0.5 – 11)	15 (6 – 32)	4/8
	Alacsony expresszió	25	7 (0.6 – 15)	25 (7 – 67.5)	12/13
	Magas Expresszió	1	4.5	15	1/-
<i>CYP2C9*1/mut</i>	Normál expresszió	9	4 (3 – 15)	19 (14.5 – 52)	5/4
	Alacsony expresszió	4	7.5 (4 -15)	22.5 (15 – 60)	1/3
<i>CYP2C9*2/*2</i>		1	7	25	1/-

\*: átlag (min; max); *CYP2C9\*1/mut*: *CYP2C9\*1/\*2* vagy *CYP2C9\*1/\**

**6. táblázat.** A betegek klinikai paramétereit egy hónappal a valproát-kezelés megkezdését követően.

Paraméter	Kontroll - csoport (N=47)	CYPtest csoport (N=51)	Szignifikancia
Valproát szérumszint (µg/ml)	85.0±36.02	72.0±21.05	ns
Valproát terápiás tartományán kívül eső betegek aránya	21/47	9/51	P=0.004
Valproát optimális terápiás szintjétől való eltérés (µg/ml)	21.2±16.17	2.98±1.90	P<0.001
Alkalikus foszfatáz (ALP; U/l)	545.1±235.81	236.0±138.76	P<0.001
ALP felső normálértékét meghaladó betegek aránya	23/47	2/51	P<0.001
Glutamát-oxálacetát aminotranszferáz (GOT; U/l)	27.3±9.77	27.5±8.66	ns
Glutamát-piruvát transzamináz(GPT;U/l)	16.1±7.93	15.8±8.50	ns
Gamma-glutamil transzferáz (γGT; U/l)	15.6±7.02	14.3±8.51	ns
Kalcium (mmol/l)	2.23±0.434	2.41±0.121	ns
Foszfor (mmol/l)	1.64±0.533	1.52±0.297	ns
Vörösvértest szám (x10 <sup>12</sup> /l)	4.5±0.48	4.6±0.46	ns
Fehérvérsejt szám (x10 <sup>9</sup> /l)	7.0±2.19	7.9±3.22	ns
Vérlemezke szám (x10 <sup>9</sup> /l)	227.1±88.06	245.4±70.81	ns

ns: nem szignifikáns, P > 0,05



**10. ábra.** A betegek stabil valproát-szintjei a két különböző csoportban. (Kontrollcsoport  $N=47$ ; CYPtest csoport  $N=51$ ; valproát terápiás vérszintje 40 és 100  $\mu\text{g/ml}$  között megjelölve)

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 gyógyszerzedés 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 (6. táblázat). A kontrollcsoportban szignifikánsan magasabb alkalikus foszfatáz-szinteket észleltünk, mely akár hepatotoxicitásra, akár csontanyagcsere-zavarra is utalhat. Mindemellett a transzamináz, a kalcium-, ill. foszforszintekben nem észleltünk különbséget a csoportok között. Az alkalikus foszfatáz szintje gyermekeknél az életkorral jelentősen változik (Shaw és mtsai, 2014), 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 (7. táblázat). 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 ( $>750$

U/l, de 1200 U/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 ( $P=0,05$ ; 7. táblázat).

**7. táblázat.** A két csoportban az egyes mellékhatások előfordulási aránya

Mellékhatások	Kontroll-csoport (N=47)	CYPtest csoport (N=51)	Szignifikancia
Súlyos:	14/47	2/51	$P<0.001$
Hyperammonemia	8/47	1/51	$P=0.01$
Hányinger	1/47	1/51	ns
Thrombocytopenia	2/47	0/51	ns
Bőrkiütés	1/47	0/51	ns
Zavartság, eszméletvesztés	2/47	0/51	ns
Mérsékelt	18/47	10/51	$P=0.05$
Hajhullás	3/47	2/51	ns
Aluszékonyság	6/47	4/51	ns
Bevizelés	2/47	1/51	ns
Fáradtság	3/47	1/51	ns
Evés-kényszer, súlygyarapodás	3/47	2/51	ns
Hangulatzavar	1/47	0/51	ns

ns: nem szignifikáns,  $P > 0,05$



#### 4.4. Esetismertetés

Egy 10 napos csecsemő (1850 grammal született a 31. gesztációs héten) került felvételre a Heim Pál Gyermekkórház Madarász utcai Kórházába (Budapest). A Perinatális Intenzív Centrumban elvégzett vizsgálatok szerint perinatálisan a subependymális régió bevérzett („intraventriculáris vérzés kamratágulat nélkül - grade II”), a jobb felkaron észlelt mioklonusos epizódok, ill. az EEG-eltérések alapján phenobarbitál kezelést (2 mg/kg) indítottak nála a hetedik napon. Mivel a hosszútávú phenobarbitál kezelés figyelem- ill. memóriazavarokat okozhat, ezért a beteg felvételét követően a phenobarbitált valproátra cseréltük le. A céldózis 30 mg/kg volt. 17 nappal a valproát-kezelés indítása után a gyermeknél csontvelődepléción (haematocrit: 17,7%; haemoglobin: 59 g/l, fehérvérsejt:  $5,1 \times 10^9/l$ , thrombocytá:  $39 \times 10^9/l$ ) és hyperammonaemia jeleit (92  $\mu\text{mol/l}$ ) észleltük, ill. emelkedett alkalikus foszfatáz (1695 U/l) szintet mértünk. A toxicitás egyértelműen a valproátnak volt tulajdonítható, ezért adását azonnal felfüggesztettük. Tíz nappal a valproát leállítását követően a valproát vérszintje még mindig 19,5  $\mu\text{g/ml}$  (LC-MS meghatározás alapján) volt. A gyermek vörösvértest transzfúzióra szorult, azonban a vérlemezke-, ill. fehérvérsejt-szám 6 nap alatt spontán normalizálódott. A magas alkalikus foszfatáz-szint 1 hónap alatt, míg a magas ammóniaszint fokozatosan, 10 nap alatt rendeződött.

Mivel felmerült bennünk, hogy esetleg enzimhiány állhat a toxikus tünetek hátterében, ezért CYPtest<sup>TM</sup>- vizsgálatra, az MTA Természettudományi Kutatóközpontjába (Budapest) kiküldtük a beteg vérmintáját. A CYP-analízist követően bebizonyosodott, hogy a beteg *CYP2C9\*3/\*3* (homozigóta mutáns) genotípust hordoz, amely magyarázatul szolgál a rendkívül lassú valproát-metabolizmusra, így a valproátnak tulajdonítható súlyos toxicitási tünetek megjelenésére is. Később a gyermek családjában is elvégeztük a farmakogenetikai vizsgálatot, édesanyja, édesapja, ill. testvére is *CYP2C9\*1/\*3* heterozigóta genotípusúnak bizonyult.

Ahogy az előző fejezetekben szerepel, gyermekeknél, de különösen az újszülötteknél a valproát metabolizmusát elsődlegesen a *CYP2C9* katalizálja, így a két, funkcióvesztő mutációt hordozó alléllal rendelkező betegeknél a valproát metabolizmusa csökkent intenzitással zajlik. A klinikai protokoll szerint a betegeknél alacsony (10-15 mg/kg) dózissal indul a valproát-kezelés, majd fokozatosan, a tünetek alapján (epileptikus tünetek megszűnése, valproát mellékhatások hiánya) érhető el a terápiás dózis. A valproát vérszintjének ellenőrzésére (a protokoll alapján) csak a kezelés megkezdését követően 3-4

héttel kerül sor, ezalatt a kezelőorvos csak a tünetek és a mellékhatások alapján tájékozódhat az antiepileptikus terápia helyességéről. A *CYP2C9*-genotípus ismerete azonban már a kezelés megkezdésekor segítséget nyújthat a terápia megtervezéséhez. A két funkcióvesztő allélt hordozók (*CYP2C9*\*2/\*2, *CYP2C9*\*3/\*3, *CYP2C9*\*2/\*3) előfordulási gyakorisága viszonylag magas az európai fehér populációban (2-10%), így a *CYP2C9*-genotípus vizsgálatot érdemes elvégezni még a valproát-kezelés indítása előtt. A két funkcióvesztő alléllal rendelkező betegeknél valproát helyett egyéb alternatív antiepileptikus terápia alkalmazása javasolható.

Esetünkben, amennyiben a gyermeknél a valproát-kezelés indítása előtt megtörtént volna a CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálat, valószínűleg elkerülhető lett volna a súlyos, életet veszélyeztető toxicitás (Nagy és mtsai, 2015).

## 5. Megbeszélés

A gyógyszerlebontó-képesség nagyban befolyásolja a betegek terápiás választát, ill. a mellékhatások kialakulásának kockázatát. A gyógyszerlebontásban igen nagy jelentőséggel bírnak a CYP-enzimek, melyek genetikai polimorfizmusai alapján a populáció gyenge-, átlagos- és gyors metabolizálókra osztható fel (Ingelman-Sundberg, 2001). A képet tovább színesíti, hogy endogén, ill. exogén hatásokra a génexpresszió folyamatosan változik az egyén élete folyamán, mely miatt kialakulhat az adott enzimek alacsony, átlagos, vagy fokozott expressziója (Monostory és Pascussi, 2008). Az elterjedt farmakogenetikai vizsgálatok kizárólag genetikai polimorfizmusokat vizsgálva próbálják megbecsülni az egyéni gyógyszer-metabolizmus szintjét. A génexpresszió vérmintából történő meghatározása csak az elmúlt években vált lehetővé (Temesvári és mtsai, 2012).

Az egyéni gyógyszerigényt a fentiek mellett szintén befolyásolják az életkori különbségek. Az újszülöttek CYP-dependens gyógyszer-metabolizmusa alacsony (a felnőtt szint 50-70 %-a), azonban igen hamar megugrik, két éves korra a felnőtt szintet jóval meghaladja, és csak a pubertás után csökken a felnőttekre jellemző szintre (Stewart és Hampton, 1987). Ezzel ellentétben újszülötteknél a gyógyszerek glükuronidációja egyáltalán nem működik, vagy igen alacsony szintű. A glükuronidációs folyamatok aktivitása igen lassan növekszik, pubertásra sem éri el a felnőttekre jellemző szintet (McCarver és Hines, 2002).

Ha a valproát vonatkozásában nézzük e folyamatokat, gyermekek esetében egyértelműen CYP-dependens valproát-metabolizmussal kell számolnunk, ráadásul tartós valproát adagolás mellett a mitokondriális  $\beta$ -oxidáció is zavart szenved (Ponchaut és mtsai, 1992.). Így érthető, hogy miért van nagy jelentősége gyermekkorban a CYP-enzimeknek a valproát lebontása során, ill. a CYP-enzimek genetikai eltéréseinek a valproát indukálta toxicitás kialakulásában (Ho és mtsai, 2003; Kiang és mtsai, 2006)

A CYP2C9, mely a valproát-degradáció legfontosabb enzime, igen nagy genetikai polimorfizmust mutat. A *CYP2C9\*2* és a *CYP2C9\*3* a leggyakrabban előforduló allélvariációk a kaukázusi népcsoportban (Zanger és mtsai, 2008, Kurose és mtsai 2012). Ezek, a funkcióvesztést okozó mutációk *in vivo* is bizonyítottan gyengébb metabolizmushoz vezetnek (Ho és mtsai, 2003).

Néhány tanulmány megpróbált már összefüggést találni a valproát szérumkoncentrációja, ill. a *CYP2C9*-genotípus között (Tan és mtsai, 2010, Guo és mtsai,

2012), több-kevesebb sikerrel. Statisztikailag szignifikáns, de relatíve kicsi különbséget észleltek *CYP2C9\*3* allél jelenléte esetén, összehasonlítva a mutáció nélküli betegekkel (Tan és mtsai, 2010). A szerzők csupán kisfokú normalizált valproát vérszint-emelkedést észleltek a *CYP2C9\*1/\*3* genotípusú betegeknél, mely feltehetőleg két tényező figyelmen kívül hagyása miatt lehetett: a szerzők nem vették számításba sem a *CYP2C9*-génexpressziót, sem a lebontás korszpecifikus különbségeit. Guo és munkatársai viszont semmilyen összefüggést nem találtak a *CYP2C9\*3* allél jelenléte és a valproát szérumszintek között (Guo és mtsai, 2012). Ennek oka feltehetőleg az volt, hogy a szerzők csak genotípus alapon voltak lekövetkeztetéseket és nem vették figyelembe a *CYP2C9*-génexpressziót.

Az egyén aktuális gyógyszer-metabolizmusára a genotipizálás adataiból következtetni nem egyszerű, még a nem indukálható enzimek (mint pl. a *CYP2D6*) esetében sem (Hicks és mtsai, 2014). Temesvári és munkatársai (Temesvári és mtsai, 2012) 60-szoros különbséget észleltek a különböző betegek májszövet *CYP2C9* mRNS szintjeiben, ami azt jelenti hogy átmeneti gyenge metabolizálók (poor metabolizer) is vannak a *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú betegek között. Ezért nemcsak a genetikai háttér, hanem az aktuális génexpresszió feltérképezése is fontos, ha az aktuális valproát-metabolizmusról szeretnénk információt kapni.

### ***5.1. Valproát-dózisigény a CYP2C9-státusz függvényében***

Az I. vizsgálatba beválogatott betegeket a *CYP2C9*-genotípus alapján két csoportba osztottuk (*CYP2C9\*1/\*1* és *CYP2C9\*1/mut*), emellett a *CYP2C9*-expresszió alapján megállapítottuk, hogy mindkét csoport tartalmaz alacsony, ill. normál mértékben expresszáló gyerekeket is. A *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú betegeknél általában átlagos metabolizmust feltételezünk, azonban a normál metabolizmus módosulhat a csökkent enzimexpresszió miatt és a beteg gyenge metabolizálónak válhat. Meg kell említeni azt is, hogy a mutáns allélek hibás fehérjékké íródnak át, ezért csökkent metabolizmushoz vezetnek, még akkor is, ha a hibás enzim átlagos mértékben expresszálódik.

Jelen vizsgálatunkba 15 év alatti gyermekeket vontunk be, akiknél egyértelműen igazoltuk, hogy a valproát normalizált szérumszintjei tükrözik a *CYP2C9*-státusz egyéni különbségeit. A gyerekek heterozigóta *CYP2C9*-genotípus mellett (*CYP2C9\*1/\*2* vagy *CYP2C9\*1/\*3*) gyenge valproát-metabolizmust mutattak, melyhez magasabb gyógyszer szint és alacsonyabb valproát-dózisigény társult. A homozigóta vad (*CYP2C9\*1/\*1*) genotípusú betegek normál működésű enzimet termelnek, azonban a valproát metabolizmusát a *CYP2C9*-

expressziója befolyásolja. Alacsony expressziójú, *CYP2C9* polimorf allélt nem hordozó betegek a polimorf allélt hordozó heterozigóta betegekhez hasonlóan alacsony metabolizmusúnak bizonyultak, míg a homozigóta vad genotípusú, normál expressziójú betegek a lényegesen gyorsabb valproát-metabolizmus miatt szignifikánsan magasabb gyógyszerigényt, ill. szignifikánsan alacsonyabb szérumszinteket produkáltak.

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 dózisszükségletében 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 expresszáló, ill. *CYP2C9\*1/mut* normál expresszáló csoportok között nincs szignifikáns különbség).

A betegeknél tapasztalható CYP-fenokonverzió általában külső-belső hatásokkal magyarázható, úgymint gyógyszerhatás, táplálkozás, betegségek, gyulladás, hormonháztartás, amelyek a gyógyszerlebontó-enzimek expresszióját és működését befolyásolják. A valproát egyes antiepileptikus gyógyszerekkel (phenytoin, phenobarbitál, carbamazepine) történő együttes alkalmazása fokozott *CYP2C9*-expresszióhoz és megnövekedett valproát-lebontó kapacitáshoz vezet. Amini-Shirazi és munkatársai azt észlelték, hogy a valproát együttes adása egyéb *CYP2C9*-induktorokkal növeli a 4-én-valproát képződését, a valproát monoterápiával összehasonlítva (Amini-Shirazi és mtsai, 2010). Az általunk észlelt expressziós különbségek nem származhattak *CYP2C9*-indukcióból, hiszen a gyermekek valproát monoterápiában részesültek. Alacsony *CYP2C9*-expressziójú betegek furcsa módon igen nagy arányban voltak a betegek között, a betegek több mint fele alacsony expressziót mutatott, ami valamilyen szupprimáló faktor jelenlétére utalhat. Az epilepsziás betegek roham utáni jelentős citokin-emelkedése logikus magyarázat lehet, hiszen a gyógyszer-metabolizáló enzimek 'down-regulációja' figyelhető meg akutfázis-fehérjék hatására, ami csökkent gyógyszer-metabolizmushoz vezet (Aitken és mtsai, 2006; Yu és mtsai, 2012; Uludag és mtsai, 2013). A feltételezések szerint a *CYP2C9* 'down-regulációja' a *CYP*-gén transzkripciójában meghatározó szerepet játszó nukleáris receptorok (pregnane X receptor; konstitutív androstane receptor) szuppressziója miatt történik, amely a rohamok során

felszabaduló proinflammatorikus citokinek (IL-6; IL-1 $\beta$ ) hatására jön létre (Pascussi és mtsai 2000; Pascussi és mtsai, 2003).

Az epilepsziás rohamok hatására bekövetkező, CYP2C9-fenokonverzióhoz hasonló jelenség figyelhető meg más megbetegedések esetén is. HIV-fertőzés, daganatos megbetegedések, ill. májbetegség esetén a CYP2C19-, CYP2D6-, CYP3A4-enzimek alacsony aktivitását tapasztalták (Rost és mtsai, 1995; O'Neil és mtsai, 1997; Aitken és Morgan, 2007; Helsby és mtsai, 2008; Jones és mtsai, 2010; Burns és mtsai, 2014).

A mi vizsgálatunk az első, amely egyértelmű bizonyítékkal szolgál epilepsziás betegek CYP2C9-fenokonverziójára, ill. a CYP2C9-szuppressziójára m. sacemben szenvedő gyermekeknél.

Az általunk elsőként leírtak (Tóth és mtsai, 2015) alapján kijelenthető, hogy az epilepsziás gyermekek normalizált valproát-koncentrációit az aktuális CYP2C9-státusz határozza meg, ami azt jelenti, hogy nemcsak a betegek genetikai variabilitása felelős az eltérő gyógyszerhatásért és vérszintekért, hanem a lebontásért felelős CYP2C9-enzim aktuális expressziója is. A beteg gyerekek CYP2C9-státuszuktól függően különböző gyógyszer dózisokat igényelnek. Az alacsony CYP2C9-expresszálók, ill. *CYP2C9* polimorf allélt hordozó betegek a *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú, normál expresszálókhoz képest 50%-al alacsonyabb dózist igényelnek (14-18 mg/kg, vs. 33 mg/kg). A CYP2C9-státusz felmérése megfelelően előrejelzi az egyén adott gyógyszerigényét, ezért ennek a vizsgálatnak elvégzése javasolható az antiepileptikus kezelés megkezdése előtt. Szintén javasolt az alacsony expressziót mutató, ill. heterozigóta mutációt hordozó betegek céldózisának a normál dózis kb. felére csökkentése. Az alacsony esetszám ellenére az eredmények alapján a konvencionális terápia alkalmazása gyermekek esetében aggályosnak mondható, hiszen ez a dozírozás a betegek több mint 70 %-ánál a terápiásnál magasabb gyógyszer szinteket eredményezhet. Az is egyértelműnek látszik, hogy önmagában a CYP2C9-genotipizálás nem megoldás, hiszen ha csupán a genotípus eredménye alapján állítanánk be a gyógyszerelést, a *CYP2C9* polimorf allélt nem hordozó betegek (*CYP2C9\*1/\*1*) kb. 2/3-ának túldozírozása várható. Összességében kijelenthető, hogy az epilepsziás gyermekeknél tapasztalható CYP2C9-fenokonverzió miatt a CYP2C9-genotipizálás prediktív értéke korlátozott a valproát-kezelés optimalizálása során.

## 5.2. A *CYP2C9*-státusz vezérelt valproát-terápia klinikai jelentősége

A *CYP2C9*\*2 és *CYP2C9*\*3 allélokban található mutációk funkcióvesztést okoznak, ami bizonyos drogok (valproát, warfarin, antidiabetikus szerek) metabolizmusát csökkentik, és a mellékhatások gyakoriságát, súlyosságát növelhetik (Zachara és mtsai, 1988; Kirchheiner és mtsai, 2004; Zhou és mtsai, 2009; Zanger, 2013). Ennek megfelelően az alacsony *CYP2C9*-expressziót is hasonló kockázati tényezőnek tekinthetjük gyermekek valproát kezelése során.

Hematológiai eltérések, hepatotoxicitás, hyperammonaemia a valproát-kezelés ritka mellékhatásai, azonban időnként életet veszélyeztetőek is lehetnek (Kochen és mtsai, 1983; Dreifuss és Langer, 1987; Fisher és mtsai, 1992; Nanau és Neuman, 2013). A valproátról azt feltételezik, hogy direkt csontvelő-károsító. Májtoxicitásban azonban a valproát mellett a valproát metabolitjainak is nagy szerepe van (Fisher és mtsai, 1992; Siemes és mtsai, 1993; Nanau és Neumann, 2013).

A mellékhatások megelőzése érdekében nem javasolt valproát alkalmazása akkor, ha a CYPtest<sup>TM</sup> két mutáns allélt igazol (*CYP2C9*\*2/\*2, *CYP2C9*\*3/\*3 vagy *CYP2C9*\*2/\*3), míg egy mutáns allél esetén a szokásos dózis csökkentése szükséges. A konvencionális valproát-kezelés során a valproát napi céldózisát 30-40 mg közé állítjuk be. Az előző (I. számú) vizsgálat során úgy találtuk, hogy ez az adagolás csak abban az esetben alkalmazható, ha a gyermeknél nincs *CYP2C9*-mutáció, és normál *CYP2C9*-expresszió mutatható ki. *CYP2C9*\*1/\*1 genotípusú betegektől normál metabolizmust várnánk, azonban a rohamok okozta *CYP2C9*-fenokonverzió miatt alacsony fokú metabolizmus alakulhat ki, mely a valproát okozta mellékhatások megjelenéséhez vezethet.

A II. vizsgálat során, amennyiben a CYPtest csoport betegein hagyományos valproát-dozírozást alkalmaztunk volna, az a legtöbb beteg számára inadekvát lett volna, ami a betegek túldozírozását jelenti. A homozigóta mutáns, *CYP2C9*\*2/\*2 genotípusú betegnél a mellékhatások fokozott kockázatával számolhattunk, ugyanakkor a betegcsoport 75%-ánál is a kívánatosnál magasabb gyógyszer szintek alakulhattak volna ki. A hagyományos klinikai protokoll szerint a valproát kialakult, "steady-state" vérszintjét 3-4 hét után ellenőrzik, ezért addig a kezelőorvos az esetleges túladagolásról csupán a mellékhatások észlelése kapcsán szerez tudomást.

A CYP2C9-státusz vezérelte valproát-kezelés előnye jól látható a precíz valproát-adagolás, ill. a mellékhatások csökkentése kapcsán. A CYP2C9-státusz ismerete a kezelés kezdete előtt segít a gyógyszerválasztásban (valproát vagy más alternatív antiepileptikum), ill. az optimális dózis meghatározásában. Az így végzett gyógyszerbeállítás alapján könnyebb a terápiás vérszint beállítása és elkerülhető a szélsőséges vérszintek kialakulása.

Az alkalikus foszfatáz szintje sokkal alacsonyabb azoknál a gyerekeknél, akiknél a gyógyszerbeállítás előtt a CYPtest<sup>TM</sup> elvégzésre került. Az alkalikus foszfatáz abnormalitásai társulhatnak hepatotoxicitáshoz, ill. a csontanyagcsere-zavarához is. Hosszútávú (hat hónapnál hosszabb) valproát-kezelés csökkent csontsűrűség kialakulásához vezethet (Guo és mtsai, 2001). Betegeink az adatok feldolgozásának időpontjában csupán 1 hónapja kapták a valproátot, a szérum kalcium- ill. foszforszintek a normál tartományban voltak, ezért a kontrollcsoportban észlelt szérum alkalikus foszfatáz emelkedés inkább egyéb patomechanizmusra utal. A hyperammonaemia, amelyet a kontrollcsoport gyermekeinél gyakrabban észleltünk, az ureaciklus zavarával is társulhat (Aires és mtsai, 2011.). A hyperammonaemia a betegeinkben mindig magas alkalikus foszfatáz és magas valproát-szintekkel (>100 µg/ml) jelentkezett, így az alkalikus foszfatáz emelkedése inkább májérintettségnek tulajdonítható. A szérum ammóniaszint emelkedésének a hepatotoxicitás előrejelzése szempontjából egyébként gyenge prediktív értéke van, ezért rutinszerűen nem is alkalmazzák a hepatotoxicitás felismerése céljából. Mindemellett az emelkedett ammóniaszintet gyakran társítják valproát indukálta encephalopathiával. Éppen ezért a szérum ammóniaszintjét hányinger, hányás, étvágytalanság, fáradtság, álmoság, zavartság, meglassultság vagy eszméletvesztés esetén célszerű megmérni (Tseng és mtsai, 2014). Az imént felsorolt mellékhatások legalább egyikét észleltük a vizsgált hyperammonaemiás gyermekeknél, így a hyperammonaemia akár az encephalopathia esetleges kialakulásának prognosztikus jele is lehet.



## 6. 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.

## 7. Összefoglalás

Az antiepileptikus kezelés elsőként választható gyógyszere a valproát, amely az esetek többségében egy biztonságosan alkalmazható szer, azonban ritkán súlyos mellékhatások is előfordulhatnak. Felnőtteknél a valproát leggyakoribb metabolikus útja a glükuronidáció és a mitokondriális  $\beta$ -oxidáció, a CYP-dependens lebontás kevésbé jelentős. Ezzel szemben gyermekeknél e vegyület lebontásában leginkább a CYP2C9-enzim vesz részt. Így, ha a CYP2C9-enzim aktivitása lecsökken, az súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet gyermekeknél. A CYP2C9-enzim genetikai polimorfizmusa esetenként magyarázatot adhat az egyéni gyógyszerlebontó-képesség eltéréseire, azonban az aktuális enzimexpresszió időről időre változhat. A *CYP2C9*-genotípus meghatározása gyermekek esetében mintegy 30 %-ban tudja előrejelezni a gyenge valproát - metabolizmust. A *CYP2C9*-expresszió jelentősen csökkent a betegek 2/3-ában, mely feltehetőleg az epilepszia kórképben a rohamok során felszabaduló citokineknek köszönhető. A *CYP2C9* fenokonverzióját, mely a *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú gyermekekben gyenge *CYP2C9*-metabolizmus kialakulásához vezet, elsőként igazoltuk. Epilepsziás gyermekekben szoros korreláció figyelhető meg a *CYP2C9*-enzimexpresszió, ill. a kialakult normalizált valproát vérszint között, amely azt is alátámasztja, hogy a valproát metabolizmusának legfontosabb enzime gyermekkorban a *CYP2C9*. A *CYP2C9*-genotipizálás és *CYP2C9*-expresszió meghatározás együttes alkalmazása előrejelezheti a beteg aktuális valproát-szükségletét. Bár a *CYP2C9\*1/\*1* genotípusú, átlagosan expresszáló betegekben megfelelő a konvencionális valproát-kezelés során alkalmazott gyógyszerdozírozás (30-40 mg/kg), a polimorf *CYP2C9* allélt hordozó, ill. alacsony *CYP2C9*-expressziót mutató betegek esetében alacsonyabb, csupán 14-18 mg/kg napi dózist tartunk kívánatosnak.

A valproát-kezelés megkezdését megelőző *CYP2C9*-státusz meghatározás egyértelműen előnyösebb, mint az önálló *CYP2C9*-genotipizálás. A *CYP2C9*-státusz vezérelt gyógyszerbeállítás hatékony, annak ellenére, hogy a hagyományos kezelési protokollhoz képest adott esetben kisebb az alkalmazott gyógyszeradag. A CYPtest<sup>TM</sup> vizsgálati eredményekhez igazított valproát-dózis alkalmazásával optimális vérszint érhető el. Ennek megfelelően a mellékhatások gyakorisága is csökken. Az életet veszélyeztető mellékhatások teljes egészében kiküszöbölhetőek, a súlyos mellékhatások (hyperammonaemia, májtoxicitás) kockázata szignifikánsan csökken, és a mérsékelt mellékhatások kialakulásának kockázata is csökkenthető. Összességében a módszer minden gyermekepilepszia-centrum számára javasolt, remélhetően széles körben elterjed majd a kis betegek megalapozására.

## 8. Summary

One of the first choices of antiepileptic therapy is valproic acid (VPA), which is generally well-tolerated, and rarely induces serious side effects. In adults, the majority of VPA dose is eliminated by glucuronidation and mitochondrial  $\beta$ -oxidation, whereas the cytochrome P450 (CYP) dependent metabolism is less pronounced. In contrast, CYP catalyzed oxidation may become the principal route of the metabolism in children. Thus, reduced CYP-enzyme activity can lead to serious side effects in pediatric patients.

Although genetic polymorphism of *CYP2C9* may explain some interindividual differences in pharmacokinetics and dose requirement of VPA, non-genetic factors cause low or even high *CYP2C9* expression, modifying the patient's VPA metabolizing capacity. *CYP2C9* genotyping alone of pediatric patients was able to predict VPA poor metabolism in approximately 30% of patients.

*CYP2C9* expression was downregulated in two-thirds of children carrying homozygous wild genotype (*CYP2C9\*1/\*1*), probably due to the cytokine release in epilepsy. This is the first evidence of *CYP2C9* phenoconversion in epileptic children. Moreover, we have proven that normalized serum concentrations of VPA were associated with patients' *CYP2C9*-status determined by *CYP2C9* genotyping and *CYP2C9* expression. These findings also confirmed that the most important enzyme in the metabolism of valproate is *CYP2C9* in children.

Evaluation of CYP-genotype and current CYP-expression can predict the VPA dosing appropriate for the therapeutic blood concentration. Although the VPA therapeutic strategy for the normal *CYP2C9* expressers with *CYP2C9\*1/\*1* genotype can follow the conventional therapy (target VPA dose of 30–40 mg/kg), the low expressers and patients carrying loss-of-function mutation in *CYP2C9* gene require substantial modification of VPA dose (14–18 mg/kg) for achieving the desired target serum concentrations.

Inferring the patients' valproic acid metabolizing phenotype from the *CYP2C9* genotype and *CYP2C9* expression can lead to appropriate prediction. *CYP2C9*-status guided VPA therapy is safe and effective, despite of lower VPA dosages. The *CYP2C9*-status guided strategy leads to optimal VPA levels, and can contribute to the avoidance of misdosing and potential adverse reactions in pediatric patients.

Overall, the method is recommended for everyone, who treats epileptic children.

## 9. Irodalomjegyzék

- Abbott** FS, Anari MR. (1999) Chemistry and biotransformation. In Loscher W (Ed) Milestones in drug therapy, valproate. Basel: Birkhauser Verlag, 47-75.
- Aires** CC, van Cruchten A, Ijlst L, de Almeida IT, Duran M, Wanders RJ, Silva MF. (2011) New insights on the mechanisms of valproate-induced hyperammonemia: inhibition of hepatic N-acetylglutamate synthase activity by valproyl-CoA. *J Hepatol* 55:426-434
- Aitken** AE, Morgan ET. (2007) Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 35(9): 1687-1693.
- Aitken** AE, Richardson TA, and Morgan ET (2006) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:123–149.
- Amini-Shirazi** N, Ghahremani MH, Ahmadkhaniha R, Mandegary A, Dadgar A, Abdollahi M, Shadnia S, Pakdaman H, Kebriaeezadeh A. (2010) Influence of CYP2C9 polymorphism on metabolism of valproate and its hepatotoxin metabolite in Iranian patients. *Toxicol. Mech. Methods.* 20(8), 452-457.
- Brockmüller** J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. (2000) Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment, *Pharmacogenomics*, 1, 125-151.
- Burns** KE, Goldthorpe MA, Porteus F, Browett P, Helsby NA. (2014) CYP2C19 genotype-phenotype discordance in patients with multiple myeloma leads to an acquired loss of drug-metabolising activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73(3): 651-655.
- Búdi** T, Tóth K, Nagy A, Szever Z, 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) pp. 849-855.
-

- Cloyd JC, Fischer JH, Kriel RL, Kraus DM.** (1993) Valproic acid pharmacokinetics in children. IV. Effects of age and antiepileptic drugs on protein binding and intrinsic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 53: 22–29.
- Cowan L.** The epidemiology of the epilepsies in children. (2002) *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 171-81
- Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, and Slatter JG** (2011) Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos* 39:1415–1422.
- Dreifuss FE, Langer DH.** (1987) Hepatic considerations in the use of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 28(suppl 2):S23-29.
- Edward JC.** (2001) Seizure types, epilepsy syndromes, etiology and diagnosis, *CNS Spectrums*, 9, 750-755.
- Fisher E, Siemes H, Pund R, Wittfoht W, Nau H.** (1992) Valproate metabolites in serum and urine during antiepileptic therapy in children with infantile spasms: abnormal metabolite pattern associated with reversible hepatotoxicity. *Epilepsia* 33:165-171.
- Fogarasi A, Neuwirth M, Gyorsok Z, Czirják S, Vajda J, Bognár L.** Epilepsziasebészeti gyermekkorban: elmélet és gyakorlat. (2003) *Orv Hetil.* 30;144(48): 2359-65.
- Fogarasi A.** Gyermek- és fiatalkori epilepszia típusok : <http://www.epilepszia.hu/cikkek/mi-az-epilepszia/213/gyermek-es-fiatalkori-epilepszia-tipusok> (2015)
- Forsgren L.** Incidence and prevalence. In: Wallace SJ, Farrell K, editors. *Epilepsy in children*. 2nd ed., London, UK: Arnold Publ.; p. 21-5. (2004)
- Gal P, Oles KS, Gilman JT, Weaver R.** (1988) Valproic acid efficacy, toxicity and pharmacokinetics in neonates with intractable seizures. *Neurology*; 38: 467–471.
- Gandhi A, Moorthy B, and Ghose R** (2012) Drug disposition in pathophysiological conditions. *Curr Drug Metab* 13:1327–1344.
-

- Ghodke-Puranik Y**, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK Altman RB, Klein TE. (2013) Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 23: 236–241.
- Ginsberg G**, Hattis D, Sonawane B, Russ A, Banati P, Kozlak M, Smolenski S, Goble R. (2002) Evaluation of child/adult pharmacokinetic differences from a database derived from the therapeutic drug literature. *Toxicol Sci* 66:185-200.
- Guerrini R**. (2006) Valproate as a mainstay of therapy for pediatric epilepsy. *Paediatr. Drugs* 8(2), 113–129.
- Guo CY**, Ronen GM, Atkinson SA. (2001) Long-term valproate and lamotrigine treatment may be a marker for reduced growth and bone mass in children with epilepsy. *Epilepsia* 42:1141-1147.
- Guo Y**, Hu C, He X, Qiu F, Zhao L. (2012) Effects of UGT1A6, UGT2B7, and CYP2C9 genotypes on plasma concentrations of valproic acid in Chinese children with epilepsy. *Drug Metab Pharmacokinet* 27:536-542.
- Halász P**, Vajda J, Czirják SJ (2004) Az epilepszia műtéti kezelése, *Ideggyógyászati Szemle*, 57, 189-205.
- Halász P**. Az epilepsziaellátás feltételrendszere, diagnosztikai és kezelési standardjai, *Medicom*, Budapest. (1998)
- Halász P**. Epilepsziás tünetegyüttesek, *Springer Hungarica*, Budapest. (1997)
- Handschin C.**, Meyer U.A. (2003) Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors, *Pharmacological Reviews*, 55, 649-673.
- Helsby NA**, Lo WY, Sharples K, Riley G, Murray M, Spells K, Dzhelai M, Simpson A, Findlay M. (2008) CYP2C19 pharmacogenetics in advanced cancer: compromised function independent of genotype. *Br. J. Cancer*. 99(8): 1251-1255
- Hicks JK**, Swen JJ, Gaedigk A (2014) Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: a critical assessment and call for standardization. *Curr. Drug Metab*. 15(2), 218-232.
-

- Ho PC, Abbott FS, Zanger UM, Chang TK (2003)** Influence of CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes. *Pharmacogenomics J*;3:335-342.
- Horvai Gy.** Immunanalitika (Egyetemi Jegyzet <http://aak.bme.hu/Oktatas/analitikaikemia2.htm>
- Ingelman-Sundberg M (2005)** Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects, and functional diversity. *Pharmacogenomics J*, 5:6–13.
- Jakoby WB, Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Schachter DA, Shafritz DA (1994)** Detoxication: Conjugation and hydrolysis, *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, NY., pp 429-442.
- Jones AE, Brown KC, Werner RE, Gotzkowsky K, Gaedigk A, Blake M, Hein DW, van der Horst C, Kashuba AD. (2010)** Variability in drug metabolizing enzyme activity in HIV-infected patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66(5): 475-485.
- Juchau MR. (1990)** Substrate specificities and functions of the P450 cytochromes, *Life Sciences*, 47, 2385-2394.
- Kassahun K, Farrell K, Abbott F. (1991)** Identification and characterization of the glutathione and N-acetylcysteine conjugates of (E)-2-propyl-2,4- pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid, in rats and humans. *Drug Metab Dispos* 19:525–535.
- Kiang TK, Ho PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TK. (2006)** Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9\*1/\*1 genotype. *Toxicol Sci* 94:261-271.
- Kirchheiner J, Tshuridu M, Jabrane W, Roots I, Brockmüller J (2004)** The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Med* 1:63-84.
- Kóbori L, Kóhalmy K, Porrogi P, Sárváry E, Gerlei Z, Fazakas J, Nagy P, Járay J, Monostory K (2008)** Drug-induced liver graft toxicity caused by cytochrome P450 poor metabolism. *Br J Clin Pharmacol.* 65(3):428-436.



- Kochen W**, Schneider A, Ritz A. (1983) Abnormal metabolism of valproic acid in fatal hepatic failure. *Eur J Pediatr* 141:30-35.
- Kruger PS**, Freir NM, Venkatesh B, Robertson TA, Roberts MS, and Jones M (2009) A preliminary study of atorvastatin plasma concentrations in critically ill patients with sepsis. *Intensive Care Med* 35:717–721.
- Kumar S**, Wong H, Yeung SA, Riggs KW, Abbott FS, Rurak DW. (2000) Disposition of valproic acid in maternal, fetal, and newborn sheep. I: placental transfer, plasma protein binding, and clearance, *Drug Metabolism and Disposition*, 28, 845-56.
- Kurose K**, Sugiyama E, Saito Y (2012) Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27(1), 9-54.
- Lee CR**, Goldstein JA, Pieper JA. (2002) Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: comprehensive review of the in-vitro and human data, *Pharmacogenetics*, 12, 251–63.
- Levy M** (1997) Role of viral infections in the induction of adverse drug reactions. *Drug Saf* 16: 1–8.
- Lewis DFV**. Guide to cytochromes P450: Structures and Function, Chapter 2: Evolution of the P450 superfamily, Taylor & Francis, London (2001), pp. 20-38.
- Löschner W**, Schmidt D. (2002) New horizons in the development of antiepileptic drugs, *Epilepsy Research*, 50, 3-16.
- Mattson RH**. (1998) Medical management of epilepsy in adults *Neurology*, 51, S15-S20.
- Mayo PR**, Skeith K, Russell AS, and Jamali F (2000) Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 50:605–613.
- McCarver DG**, Hines RN. (2002) The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(2), 361-366.

**Michael** AR, Löscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs, *Neuroscience*, 5, 553-564.

**Miners** JO, Birkett DJ Cytochrome (1998) P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 45, 525–38.

**Monostory** K, Pascussi J-M. (2008) Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s, *Acta Chimica Slovenica*, 55, 20-37.

**Monostory** K, Tóth K, Kiss Á, Háfra E, Csikány N, Paulik J, Sárváry E, Kóbori L (2015) Personalizing initial calcineurin inhibitor dosing by adjusting to donor CYP3A-status in liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*, 80(6):1429-1437.

**Morgan** ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, and Liddle C, et al. (2008) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos* 36:205–216.

**Nagy** A, Búdi T, Temesvári M, Szever Zs, Szabó PT, Monostory K (2015) Adverse events in a newborn on valproate therapy due to loss-of-function mutations in CYP2C9. *Epilepsy and Behavior Case Reports* 4: pp. 86.87

**Nanau** RM, Neuman MG. (2013) Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem* 46:1323-1338.

**Nelson** DR. (2006) Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol*. 320:1- 10.

**O'Neil** WM, Gilfix BM, DiGirolamo A, Tsoukas CM, Wainer IW. (1997) N-acetylation among HIV-positive patients and patients with AIDS: when is fast, fast and slow, slow? *Clin. Pharmacol. Ther.* 62(3): 261-271.

**Okita** RT and Masters BSS Biotransformations: the cytochromes P450. *Textbook of Biochemistry*, Devlin T. M. ed. Wiley-Liss, New York (1992), pp 981-999.

**Omura** T., Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, *Journal of Biological Chemistry*, 239, 2370-2385.

- Pascussi JM**, Dvorák Z, Gerbal-Chaloin S, Assenat E, Maurel P, Vilarem MJ. (2003) Pathophysiological factors affecting CAR gene expression. *Drug Metab. Rev.* 35(4): 255-268.
- Pascussi JM**, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. (2000) Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274(3): 707-713.
- Perucca E** (2002) Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 16 (10): 695–714.
- Perucca E**, Gatti G, Frigo GM, Crema A, Calzetti S, Visintini D (1978) Disposition of sodium valproate in epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol* 5: 495–499.
- Ponchaut S**, van Hoof F, Veitch K. (1992) In vitro effects of valproate and valproate metabolites on mitochondrial oxidations. Relevance of CoA sequestration to the observed inhibitions. *Biochem Pharmacol* 43:644-647.
- Porter TD**, Coon MJ. (1991) Cytochrome P450: multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 13469-13472.
- Reith DM**, Andrews J, Parker-Scott S, Eadie MJ (2000) Urinary excretion of valproate metabolites in children and adolescents. *Biopharm Drug Dispos* 21:327-330.
- Rodriguez-Antona C**, Donato MT, Pareja E, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. (2001) Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393, 308-315.
- Rost KL**, Brockmöller J, Esdorn F, Roots I. (1995) Phenocopies of poor metabolizers of omeprazole caused by liver disease and drug treatment. *J. Hepatol.* 23(3): 268-277.
- Sakaguchi K**, Green M, Stock N, Reger TS, Zunic J, King C. (2004) Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* 424(2), 219-225.
-

**Sanada** H, Sekimoto M, Kamoshita A, and Degawa M (2011) Changes in expression of hepatic cytochrome P450 subfamily enzymes during development of adjuvant-induced arthritis in rats. *J Toxicol Sci* 36:181–190.

**Schenkman** JB, Griem H. *Cytochrome P450*, Springer-Verlag, Berlin. (1993)

**Shah** RR, Gaedigk A, LLerena A, Eichelbaum M, Stingl J, Smith LR (2016) CYP450 genotype and pharmacogenetic association studies: a critical appraisal. *Pharmacogenomics*. 17(3):259-75.

**Shah** RR, Smith RL (2015-1) Addressing phenoconversion: the Achilles' heel of personalized medicine. *Br. J. Clin. Pharmacol* 79(2):222-40.

**Shah** RR, Smith RL (2015-2) Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug Metab Dispos*, 43(3):400-10.

**Shaw** JL, Cohen A, Konforte D, Binesh-Marvasti T, Colantonio DA, Adeli K (2014) Validity of establishing pediatric reference intervals based on hospital patient data: a comparison of the modified Hoffmann approach to CALIPER reference intervals obtained in healthy children. *Clin Biochem* 47:166-172.

**Shedlofsky** SI, Israel BC, McClain CJ, Hill DB, and Blouin RA (1994) Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 94:2209–2214.

**Shedlofsky** SI, Israel BC, Tosheva R, and Blouin RA (1997) Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women. *Br J Clin Pharmacol* 43:627–632.

**Shorvon** SD, Perucca E, Engel J. :*The Treatment of Epilepsy* (John Wiley & Sons, 2015)

**Siemes** H, Nau H, Schultze K, Wittfoht W, Drews E, Penzien J, Seidel U (1993) Valproate (VPA) metabolites in various clinical conditions of probable VPA-associated hepatotoxicity. *Epilepsia* 34:332-346.

---

- Silva** MF, Aires CC, Luis PB, Ruitter JP, IJlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I (2008) Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis* 31:205-216.
- Solus** JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, Ihrle P, Mehall JM, Edwards TL, Dawson EP. (2004) Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics*. 5:895–31.
- Stewart** CF, Hampton EM. (1987) Effect of maturation on drug disposition in pediatric patients. *Clin Pharm* 6:548-564.
- Stieger** B and Meier PJ (1998) Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 462-467.
- Strassburg** CP, Strassburg A, Kneip S, Barut A, Tukey RH, Rodeck B, Manns MP. (2002) Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut* 50:259-265.
- Sumida** A, Kinoshita K, Fukuda T, Matsuda H, Yamamoto I, Inaba T, Azuma J. (1999) Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 499-503.
- Suzuki** H and Sugiyama Y (2000) Transport of drugs across the hepatic sinusoidal membrane: sinusoidal drug influx and efflux in the liver *Semin. Liver Dis.*, 20: 251-263.
- Szirmai** I, (szerk) *Neurológia (egyetmi tankönyv) Medicina* (2001)
- Szupera** Z. (2004) Az epilepszia gyógyszeres kezelése, *Ideggyógyászati Szemle*, 57, 174-188.
- Tan** L, Yu JT, Sun YP, Ou JR, Song JH, Yu Y. (2010) The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 112(4), 320-323.
-

- Tang C**, Lin JH, Lu AYH., (2005) Metabolism-based drug-drug interactions: what determines individual variability in cytochrome P450 induction?, *Drug Metabolism and Disposition*, 33, 603-613.
- Temesvári M**, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K (2012) Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther* 341:294-305.
- 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) pp.199-207
- Tseng YL**, Huang CR, Lin CH, Lu YT, Lu CH, Chen NC, Chang CC, Chang WN, Chuang YC (2014) Risk factors of hyperammonemia in patients with epilepsy under valproic acid therapy. *Medicine* 93:e66.
- Uludag IF**, Bilgin S, Zorlu Y, Tuna G, Kirkali G. (2013) Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. *Seizure*. 22(6): 457-461.
- Waterman M.R.** (1992) Cytochrome P450: cellular distribution and structural considerations, *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 384-387.
- Waxman D.J.** (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369, 11-23.
- Wilke RA**, Musana AK, Weber WW. (2005) Cytochrome P450 gene-based drug prescribing and factors impacting translation into routine clinical practice, *Personalized Medicine*, 2, 213-224.
- Yu N**, Di Q, Hu Y, Zhang YF, Su LY, Liu XH, Li LC. (2012) A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in the plasma of epileptic patients with recent seizure. *Neurosci. Lett.* 514(1): 110-115.
- Zaccara G**, Messori A, Moroni F. (1988) Clinical pharmacokinetics of valproic acid-1988. *Clin Pharmacokinet* 15:367-389.
-

**Zanger** UM, Schwab M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138:103-141.

**Zanger** UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal. Bioanal. Chem.* 392(6), 1093-1108.

**Zhou** SF, Liu JP, Chowbay B. (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 41:89-295.

**Zhou** SF, Zhou ZW, Huang M. (2010) Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology* 278:165-188.

**Ziegler** DM, Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA ed. *Detoxication: oxidation and reduction., The liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York (1994), pp 415-427.

---

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. 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):849-855

**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 elsőszerezőség



## ***10.2. Disszertációhoz nem kötődő közlemények***

Sükösd Z., Jenővári Z., **Búdi T.** (2013) Single Incision Laparoscopic Surgery (SILS): új módszer a laparoszópos 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

## **11. 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.

## 12. Függelék

### *Ábrajegyzék*

<b>1. ábra.</b> <i>A biotranszformáció szakaszai.....</i>	<i>7</i>
<b>2. ábra.</b> <i>A valproát kémiai szerkezete.....</i>	<i>26</i>
<b>3. ábra.</b> <i>A valproát lebontásában részt vevő enzimek aktivitásának életkori különbségei.....</i>	<i>28</i>
<b>4. ábra.</b> <i>A valproát (VPA) lebontásában szerepet játszó folyamatok.....</i>	<i>29</i>
<b>5. ábra.</b> <i>A PCR reakció lépései.....</i>	<i>37</i>
<b>6. ábra.</b> <i>A betegek CYP2C9-genotípusainak megoszlása.....</i>	<i>39</i>
<b>7. ábra.</b> <i>A betegek CYP2C9-expressziós adatai.....</i>	<i>40</i>
<b>8. ábra.</b> <i>A normalizált valproát vérszintek a különböző CYP2C9-genotípusú (CYP2C9*1/*1, CYP2C9*1/mut), ill. -expressziójú (alacsony, normál) betegeknél.....</i>	<i>42</i>
<b>9. ábra.</b> <i>A valproát terápiás vérszintjének eléréséhez szükséges gyógyszeradagok a különböző CYP2C9-státuszú betegek esetében.....</i>	<i>43</i>
<b>10. ábra.</b> <i>A betegek stabil valproát-szintjei a két különböző csoportban.....</i>	<i>47</i>

## **Táblázatok jegyzéke**

<b>1. táblázat.</b> <i>CYP-enzimek jelentősebb szubsztrátjai, inhibitorai és indukáló ágensei.....</i>	<i>11</i>
<b>2. táblázat.</b> <i>Az antiepileptikumok klinikai bevezetése és a kémiai szerkezettel kapcsolatos tulajdonságuk.....</i>	<i>23</i>
<b>3. táblázat.</b> <i>Az európai fehér populációkban leggyakoribb CYP2C9-génhibák és következményeinek összefoglalása.....</i>	<i>30</i>
<b>4. táblázat.</b> <i>Az I. vizsgálatba beválasztott betegek CYP2C9-státusza, ill. demográfiai adataik.....</i>	<i>40</i>
<b>5. táblázat.</b> <i>A II. vizsgálat betegeinek CYP2C9-státusz ill. demográfiai adatai.....</i>	<i>45</i>
<b>6. táblázat.</b> <i>A betegek klinikai paraméterei egy hónappal a valproát-kezelés megkezdését követően.....</i>	<i>46</i>
<b>7. táblázat.</b> <i>A két csoportban az egyes mellékhatások előfordulási aránya.....</i>	<i>4</i>