

# Učestalost polimorfizama CYP3A4\*1B, CYP3A4\*22 i CYP3A5\*3 u hrvatskoj populaciji

---

Petreković, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:889417>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-08**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Sandra Petreković**

**Učestalost polimorfizama *CYP3A4\*1B*,  
*CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja medicinske biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Lane Ganoci.

*Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Dunji Rogić i doc. dr. sc. Lani Ganoci koje su mi omogućile izradu ovoga diplomskoga rada. Hvala Vam na savjetima, strpljenju i pristupačnosti. Zahvaljujem Zrinki Marković, kem. teh., na strpljivosti i praktičnim savjetima za vrijeme moga boravka u laboratoriju Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.*

## POPIS KRATICA

ABCB1	- o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice B 1 (engl. <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i> )
ADME	- kratica od: apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija
CPIC	- Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenomike (engl. <i>Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium</i> )
CYP	- nad-porodica metaboličkih enzima citokroma P450
CYP3A	- citokrom P450 3A
CYP3A4	- citokrom P450 3A4
CYP3A5	- citokrom P450 3A5
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina
EM	- ekstenzivni metabolizator (engl. <i>extensive metabolizer</i> )
EMA	- Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i> )
FDA	- Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>The U.S. Food and Drug Administration</i> )
FRET	- prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
IM	- intermedijarni metabolizator (engl. <i>intermediate metabolizer</i> )
LD	- neravnoteža povezanosti (engl. <i>linkage disequilibrium</i> )
MAF	- alel manje učestalosti (engl. <i>minor allele frequency</i> )
mRNA	- glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
<i>mut</i>	- mutirani alel
NM	- normalni metabolizator (engl. <i>normal metabolizer</i> )
PCR	- lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
polimorfizam	- genetička varijacija čija je učestalost u populaciji najmanje 1%
RNA	- ribonukleinska kiselina
SNP	- polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
UM	- vrlo-brzi metabolizator (engl. <i>ultrarapid metabolizer</i> )
<i>wt</i>	- alel divljeg tipa (engl. <i>wild type</i> )

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Farmakogenetika i farmakogenomika .....	1
1.2.	Sustav citokroma P450 .....	2
1.3.	CYP3A.....	3
1.3.1.	Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP3A .....	5
1.3.2.	Polimorfizmi gena <i>CYP3A4</i> i njihov utjecaj na funkciju .....	6
1.3.3.	Polimorfizmi gena <i>CYP3A5</i> i njihov utjecaj na funkciju .....	7
1.3.4.	Učestalost polimorfizama <i>CYP3A</i> .....	7
1.3.5.	Klinička značajnost polimorfizama <i>CYP3A</i> .....	9
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	16
3.	MATERIJALI I METODE .....	17
3.1.	Ispitanici i uzorci .....	17
3.2.	Izdvajanje DNA metodom QIAamp® .....	17
3.2.1.	Mjerenje koncentracije i čistoće DNA .....	20
3.3.	Genotipizacija <i>CYP3A4*1B</i> , <i>CYP3A4*22</i> i <i>CYP3A5*3</i> metodom <i>TaqMan</i> ® .....	20
3.4.	Statistička obrada podataka .....	320
4.	REZULTATI.....	331
4.1.	Učestalost alela i genotipova polimorfizma <i>CYP3A4*1B</i> .....	33
4.2.	Učestalost alela i genotipova polimorfizma <i>CYP3A4*22</i> .....	34
4.3.	Učestalost alela i genotipova polimorfizma <i>CYP3A5*3</i> .....	35
5.	RASPRAVA.....	337
6.	ZAKLJUČAK .....	37
7.	LITERATURA.....	38
8.	SAŽETAK/SUMMARY .....	48

# 1. UVOD

## 1.1. Farmakogenetika i farmakogenomika

Farmakogenomika je grana znanosti koja ispituje ulogu gena koji određuju učinkovitost i toksičnost lijeka, odnosno nuspojave lijekova te spektar gena koji određuju ponašanje lijeka i osjetljivost na lijek. Farmakogenomika ispituje utjecaje mnogih gena pa i čitavog genoma na učinkovitost i nuspojave određenog lijeka. Farmakogenetika proučava interakcije pojedinog gena i lijeka (Roden i sur., 2019).

Lijekovi u organizmu učinak postižu samo pri terapijskoj koncentraciji (Spear i sur., 2001). Kod sniženih koncentracija nema učinka, a kod povišenih koncentracija mogu se pojaviti preosjetljivost, nuspojave i toksičnost. Varijacije u terapijskom odgovoru mogu uzrokovati prolazni čimbenici - inhibicija ili indukcija, ili stalni učinci - polimorfizmi ili mutacije koji dovode do varijabilnosti gena enzima, receptora, transportera ili do posttranslacijskih promjena proteina. Farmakogenetička varijabilnost utječe na farmakodinamiku (ono što lijek radi organizmu, kako djeluje) i na farmakokinetiku (ono što organizam radi lijeku, kako ga metabolizira). Farmakodinamika obuhvaća receptore, enzime, ionske kanale, enzime imunološkog odgovora te se bavi polimorfizmima povezanima s mehanizmom djelovanja lijeka, a nevezanim uz njegovu koncentraciju. Farmakokinetika proučava enzime metabolizma lijekova, transportere, vezanje za proteine plazme, odnosno promjene koncentracije lijeka i njegovih metabolita na mjestu djelovanja (Božina i sur., 2019).

Cilj je napraviti farmakogenetički profil bolesnika koji bi omogućio predviđanje doze i odgovora na terapiju te izbor primjerenog lijeka. Genetička varijabilnost u metabolizmu lijeka rezultira razlikama u klirensu, vremenu poluživota i maksimalnoj koncentraciji lijeka u plazmi. Upravo te farmakokinetičke razlike koriste se za prilagodbu doze prema genotipu. Geni koje promatramo su ADME geni, odnosno geni koji djeluju na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju lijeka. Genetičke varijacije takvih metaboličkih enzima i transportnih proteina, ciljnih mjesta djelovanja lijeka mogu utjecati na individualne varijabilnosti u odgovoru na lijek (Hu i sur, 2019).

To sve radimo kako bismo izbjegli nuspojave lijekova. Procjenjuje se da oko 90% nuspojava lijekova nastaje pri primjeni preporučenih doza lijeka (Ingelman-Sundberg i sur., 2016). Nuspojave su također odgovorne za 7% hospitalizacija, no broj se penje i do više od 30% pacijenata u starijoj populaciji (Yip i sur., 2015; Alfirevic i sur., 2010; Tohkin i sur., 2010). S obzirom na sposobnost metaboliziranja lijeka, fenotipove dijelimo na: ekstenzivni (EM) ili

normalni (NM), intermedijarni (IM), spori/slabi metabolizam (PM) – autosomno recesivno svojstvo nastalo mutacijom ili delecijom obaju alela odgovornih za fenotipsku ekspresiju, a dovodi do nakupljanja lijeka, i vrlo brzi metabolizam (UM) – autosomno dominantno svojstvo nastalo mutacijom ili amplifikacijom gena koje dovodi do povećanog metabolizma lijeka (Caudle i sur., 2017).

Svrha metaboliziranja lijeka jest prevođenje lijeka u hidrofilne metabolite kako bi se mogli lako eliminirati iz organizma, a dijelimo ga na dvije faze: Reakcije 1. faze – prevođenje lijeka u polarniji metabolit kako bi se mogao izlučiti iz organizma. To su reakcije oksidacije, redukcije, hidrolize itd. koje se najčešće odvijaju preko sustava citokroma CYP 450. Reakcije 2. faze su one kojima nastaju polarni konjugati glukuronidacijom, sulfatacijom, metilacijom itd. pomoću odgovarajućih enzima (Cascorbi i sur., 2011; Božina i sur., 2019).

## 1.2. Sustav citokrom P450

Sustav citokroma P450 (CYP) obuhvaća veliku nad-porodicu enzima koji kataliziraju oksidativnu biotransformaciju većine lijekova i drugih lipofilnih ksenobiotika (Nelson, 2004; Guengerich, 2008). Ljudski su geni za CYP-ove organizirani u 18 porodica i većina ih ima specifične endogene funkcije, poput biosinteze steroidnih hormona, prostaglandina i žučnih kiselina. Od njih samo desetak enzima pripada porodicama 1, 2 i 3 koje su odgovorne za metaboliziranje lijekova i ksenobiotika. Puno se lijekova metabolizira u klinički relevantnim koncentracijama preko samo nekoliko enzima te nam poznavanje intrinzičnih i ekstrinzičnih faktora koji utječu na ekspresiju i funkciju tih enzima mogu pomoći u predviđanju farmakogenetičke varijabilnosti i odgovora na lijek. Ipak, većina enzima je multifaktorijalno kontrolirana uključujući dodatne polimorfizme u regulacijskim transgenima i negenetske čimbenike domaćina uključujući spol, dob, bolest, hormonalni i dnevni utjecaje i slično (Zanger i sur., 2013).

Klinički se utjecaj polimorfizama mora uzeti u obzir kod promatranja farmakologije. Ako dođe do gubitka funkcije enzima, doći će do smanjenog klirensa i povećanja koncentracije lijeka u plazmi. Ako se funkcija pojača, doći će to povećanja klirensa i koncentracija lijeka u plazmi bit će niža. Radi li se o pred-lijeku (lijek koji se tek treba metabolički aktivirati), tada će utjecaj, odnosno koncentracija aktivnog lijeka u plazmi, biti suprotna: koncentracija aktivnog lijeka u plazmi veća je kod povećanja funkcije enzima, a manja kod smanjenja funkcije enzima (Zanger i sur., 2013).

### 1.3. CYP3A

Porodica CYP3 enzima u ljudi se sastoji od samo jedne potporodice, CYP3A, koja je locirana na kromosomu 7q22.1 i veličine je 231 kb. Obuhvaća četiri gena: *3A4*, *3A5*, *3A7*, *3A43*, i tri pseudogena (*Kuban i sur., 2021*). CYP3A4 eksprimiran je u jetri, no postoji velika varijabilnost u populaciji, iako potpuna odsutnost još nikad nije dokazana (*Nelson i sur., 2004*). CYP3A4 predstavlja 14-24% mikrosomalnog P450 bazena (*Shimada i sur., 1994; Lin i sur., 2002; Wolbold i sur., 2003; Ohtsuki i sur., 2012*). Ekspresija ostalih triju izoformi iz obitelji CYP3A znatno je niža u usporedbi s CYP3A4, no kod nositelja *CYP3A5\*1*, ekspresija CYP3A4 znatno je niža te je čak usporediva s ekspresijom CYP3A5 (*Hustert i sur., 2001; Kuehl i sur., 2001; Koch i sur., 2002; Westlind-Johnsson i sur., 2003; Daly, 2006*). CYP3A4 najviše je eksprimiran citokrom P450 u intestinalnim enterocitima, ali razine su nepovezane s onima u jetri (*Ding i Kaminsky, 2003; von Richter i sur., 2004a; Daly, 2006*). U ostalim tkivima (respiratorni trakt, mozak, pluća, bubrezi) ekspresija CYP3A5 slična je ili nešto veća od CYP3A4 (*Raunio i sur., 2005; Daly, 2006; Dutheil i sur., 2008; Pavek & Dvorak, 2008; Bolbrinker i sur., 2012*).



**Slika 1.** Poredak gena i pseudogena na CYP3A lokusu (preuzeto i prilagođeno prema *Kuban i sur., 2021*)

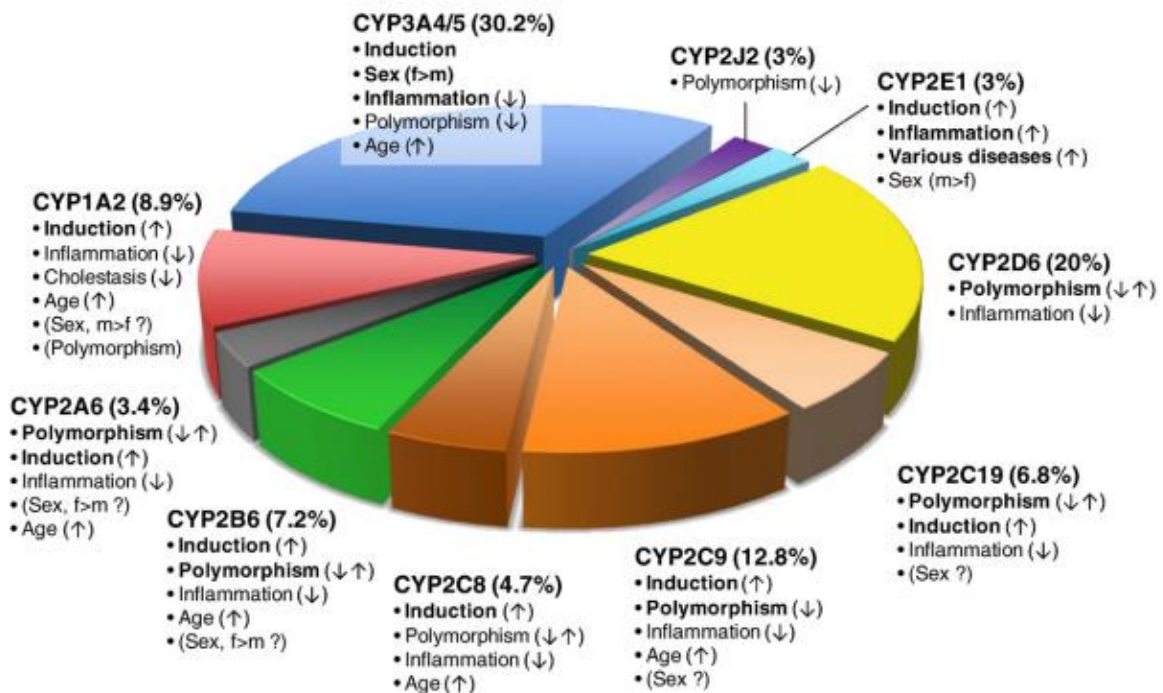
Pod-porodica CYP3A sudjeluje u metabolizmu otprilike 30% danas korištenih lijekova iz svih kategorija. (*Zanger i sur., 2013*). Aktivno mjesto CYP3A4 veliko je i fleksibilno i metabolizira lipofilne molekule relativno velike veličine (*Scott & Halpert, 2005; Hendrychová i sur., 2011*). Takvi veliki supstrati su imunosupresivi poput ciklosporina i takrolimusa, makrolidni antibiotici, lijekovi za liječenje karcinoma, ali i manje molekule poput antidepresiva, opioida, tamoksifena, benzodiazepina, nekih statina. CYP3A4 je i steroid hidroksilaza ključna u katabolizmu testosterona, progesterona, androstendiona, kortizola i žučnih kiselina. (*Fuhr i sur., 2007; Liu i sur., 2007*). CYP3A4 i CYP3A5 imaju slične supstrate što se pripisuje sličnosti u aminokiselinskom slijedu (više od 85% podudarnosti) (*Williams i sur., 2002*).



**Tablica 1.** Popis supstrata, inhibitora i induktora enzima sustava CYP3A prema Flockhartu (<https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx>) i *FDA Drug Interactions Table*\*

SUPSTRATI	INHIBITORI	INDUKTORI
<p>azolni antifungicidi (ketokonazol, itrakonazol) makrolidni antibiotici (klaritromicin, eritromicin) antiaritmiци (amiodaron, dronedaron, kvinidin) antidepresivi (amitriptilin, citalopram, escitalopram, mirtazapin, nefazodon, trazodon) antiagregacijski lijekovi (klopidogrel, tikagrelor) antipsihotici (aripiprazol, haloperidol, ziprazidon) benzodiazepini (aloprazolam, diazepam, midazolam, trazolam) beta-blokatori (propranolol) blokatori kalcijevih kanala (amlodipin, diltiazem, nifedipin, verapamil) buspiron dapson karbamazepin kofein antagonisti H1 receptora (astemizol) imunosupresivi (ciklosporin, sirolimus, takrolimus) inhibitori proteaze (indinavir, nelfinavir, ritonavir, sakvinavir) inhibitori protonске pumpe PPI (esomeprazol, omeprazol, pantoprazol) kemoterapeutici (imatinib, irinotekan, gefitinif, tamoksifen, vinkristin) klopidogrel kokain lidokain nateglinid ne-nukleozidni inhibitori RT (nevirapin) neki hipnotici (zaleplon, zolpidem) opioidi (alfentanil, kodein, tramadol) ondansteron PDE5 inhibitori (sildenafil) statini (atorvastatin, cerivastatin, lovastatin, simvastatin) steroidi (estradiol, hidrokortizon, progesteron, testosteron)</p>	<p><b><u>Snažni:</u></b> neki azolni antifungicidi (ketokonazol, itrakonazol, posakonazol*, vorikonazol) boceprevir ceritinib idelalisib inhibitori proteaze (indinavir, nelfinavir, ritonavir, sakvinavir) klaritromicin kobicistat* mibefradil, nefazodon, ribociklib telitromicin troleandomicin tukatinib</p> <p><b><u>Srednji:</u></b> aprepitant, bergamotin (sok od grejpa), ciklosporin*, diltiazem, dronedaron*, imatinib*, eritromicin, flukonazol, konivaptan*, krizotinib, netupitant/palonozetron, tofisopam*, verapamil</p> <p><b><u>Slabi:</u></b> amiodaron, atomoksetin, cilostazol*, cimetidin, entrektinib, esomeprezol, fosaprepitant*, lesinurad, lomitapid*, klorzoksazon*, kvercetin, omeprazol, pantoprazol, ranitidin*, ranolazin*, simeprevir, tikagrelor</p> <p><b><u>Nespecificirane potentnosti:</u></b> amiodaron, boceprevir, ciprofloksacin, delavirdin dietilditiokarbamat, fluvoksamin, gestoden, karambola (star fruit), klormafenikol, letermovir, mifepriston, norfloksacin, norfluoksetin, regorafenib, telaprevir, valproična kiselina</p>	<p><b><u>Snažni:</u></b> apalutamid*, enzalutamid*, fenitoin*, gospina trava*, karbamazepin*, mitotan*, rifampicin*</p> <p><b><u>Srednji:</u></b> bosentan, efavirenz, etravirin*, fenobarbital, primidon*</p> <p><b><u>Slabi:</u></b> armodafinil*, modafinil, rufinamid*, vemurafenib</p> <p><b><u>Nespecificirane potentnosti:</u></b> barbiturati brigatinib klobazam dabrafenib elagoliks eslikarbazepin glukokortikoidi modafinil lorlatinib nevirapin okskarbazepin protavancin perampanel pioglitazon rifabutin telotristat troglitazon</p>

CYP3A4 i CYP3A5 imaju aktivna mjesta različitih oblika, no oba često prepoznaju više različitih molekula jer se ta njihova aktivna mjesta mogu prilagoditi raznim oblicima. Ipak, u nekim slučajevima dolazi do preferirane katalize (u slučaju CYP3A4) ili pak selektivne inhibicije. Upravo ciljana selektivna inhibicija CYP3A5 mogla bi biti izazov u budućnosti farmakogenetike (Wright i sur., 2019).



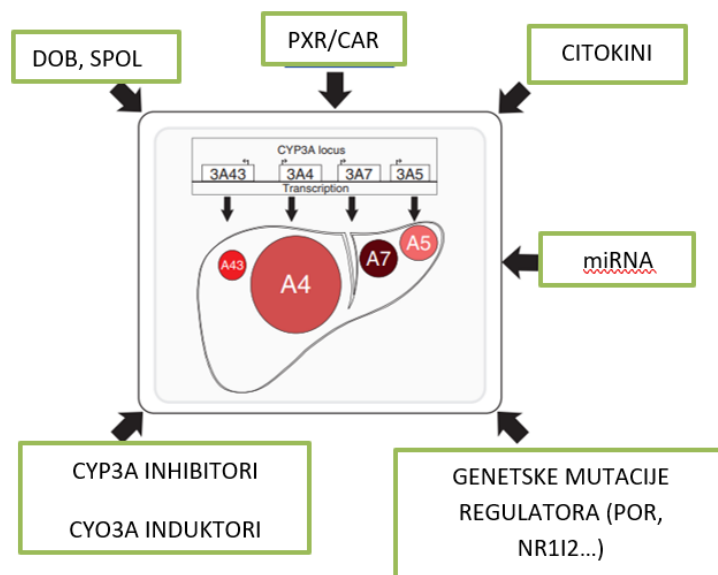
**Slika 2.** Prikaz udjela najvažnijih lijekova koji se metaboliziraju preko CYP-ova i čimbenici koji utječu na njihovu varijabilnost (preuzeto i prilagođeno prema Zanger i sur., 2013)

### 1.3.1. Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP3A

Ekspresija CYP3A5 nasljedno je veća u žena nego u muškaraca što se pripisuje spolno-ovisnoj kontroli transkripcije gena za hormonalno inducirane jetrene enzime (Thangavel i sur., 2013). CYP3A5 je detektabilan već u gestacijskom dobu i ekspresija mu ostaje konstantna i neovisna o dobi (J.C Stevens i sur., 2003; Hakkola i sur., 2001). Citokrom P450 oksidoreduktaza služi kao jedini elektron donor za CYP3A5 pa bi stanične razine oksidoreduktaza mogle utjecati na aktivnost CYP3A5 (Yablokov i sur., 2003; Yamaori i sur., 2019). Osim toga, katalitička aktivnost ovisi o prisutnosti mikrosomalnog oblika citokroma b, koji je ovisan o supstratu. Postoje i dokazi da CYP3A5 tvori protein-protein komplekse s drugim CYP-ovima (CYP3A4, CYP2E1), što opet može utjecati na interindividualnu varijabilnost (Davydov i sur., 2015). Na aktivnost mu utječu i inhibitori, uzrokujući fenokonverziju, kao i induktori, koji pojačavaju

ekspresiju gena kod osoba s funkcionalnim alelom (Klomp, 2020). Najpoznatiji inhibitor CYP3A4 svakako je sok od grejpa, a manji, ali nezanemariv utjecaj imaju i sokovi nekih drugih vrsta voća. Induktori su pak pregnan X receptor (PXR) i retinoidni X receptor (RXR) koji se zajedno kao heterodimer vežu na regulatornu regiju *CYP3A4* gena. Na to vezanje utječu mnogi ksenobiotici poput rifampicina, karbamazepina, efavirenza (Werk i Crascobi, 2014). Upalni procesi mogu smanjiti aktivnost enzima, a aktivnost mu se pojačava i s dobi (Dunvald i sur., 2021). Sumnja se još i da ekspresiju regulira duga nekodirajuća RNA koji opet uzrokuje varijabilnost i kod CYP3A5, i kod CYP3A4 (Collins i sur., 2022).

Više o konkretnim utjecajima opisano je za tarkolimus kasnije u tekstu.



**Slika 3.** Prikaz negenetičkih faktora koji utječu na aktivnost CYP3A (preuzeto i prilagođeno prema Werk i Cascorbi, 2014)

### 1.3.2. Polimorfizmi gena *CYP3A4* i njihov utjecaj na funkciju

Dosad nam je poznat utjecaj samo nekoliko SNP-ova na funkciju *CYP3A4*. Jedna od najistraživanijih varijanti *CYP3A4* gena je *CYP3A4\*1B*, koji nosi oko 5% pripadnika bijele rase. Prema nekim istraživanjima, ovaj se polimorfizam povezuje s povećanom učestalošću pojave tumora prostate i pokazala je više izraženu aktivnost nifedipin oksidaze u ljudskoj jetri (Rebbeck i sur., 1998). Funkcionalni doprinos varijante c-392A>G, odnosno *CYP3A4\*1B*, i dalje nije razjašnjen, a tome pridonosi i odnos s *CYP3A5\*1* funkcionalnim alelom. Oni se često pojavljuju zajedno i zato je teško odrediti koji od njih više pridonosi promjeni metabolizma

lijeka. Ipak, podaci istraživanja pokazuju da uzrokuje pojačanu transkripcijsku aktivnost (jer se taj polimorfizam i nalazi u promotorskoj regiji gena), ali nisu sve studije pokazale to djelovanje na transkripcijsku aktivnost (Elens i sur., 2013).

Polimorfizam *CYP3A4*\*22 prvi je puta otkriven 2011. godine. Karakterizira ga supstitucija C>T (rs35599367) na poziciji 15389 na intronu 6 (Elens i sur., 2013). Povezan je s povećanom ekspresijom mRNA u kulturi stanica, a funkcionalno djeluje tako da smanjuje aktivnost enzima. Pacijenti koji nose tu mutaciju imaju 1,7 do 5 puta manju ekspresiju *CYP3A4* mRNA, odnosno ekspresiju proteina, od onih koji ne nose tu mutaciju, što objašnjava i 12% manju aktivnost od divljeg tipa (Wang i sur., 2011). Iako je *CYP3A4* uključen u metabolizam mnogih lijekova, trenutno ne postoje smjernice za korištenje lijekova koje bi uključivale varijante gena *CYP3A4*. Uzrok tome bi mogle biti mala učestalost pojedinih varijanti u populaciji zajedno sa skromnim učinkom koji one imaju na enzimsku funkciju. Zato je i teško odrediti točnu vezu između genotipa i metabolizma lijeka, odnosno kliničkog ishoda (Zhai i sur., 2022). Ipak, *CYP3A4*\*22 povezuje se s odgovorom na terapiju statinima (Wang i sur., 2011).

### 1.3.3. Polimorfizmi gena *CYP3A5* i njihov utjecaj na funkciju

Najvažniji polimorfizam *CYP3A5* je *CYP3A5*\*3. Nositelji ovog polimorfizma nemaju ekspresiju enzima *CYP3A5* i nazivaju se non-ekspresorima *CYP3A5* te su uobičajeni fenotip u bjelačkim populacijama.. Riječ je o alelnoj varijanti *CYP3A5*\*3 (G), polimorfizma A6986G u intronu 3 (Zanger i sur., 2013). Više od 50 studija pokazalo je da kod transplantacije bubrega, srca i pluća, pacijenti s genotipom *CYP3A5*\*1/\*1 i *CYP3A5* \*1/\*3 imaju značajno niže koncentracije takrolimusa u krvi u usporedbi s onima čiji je genotip *CYP3A5*\*3/\*3. Sa svakim \*1 alelom, potrebno je dozu povećati 1,5 do 2 puta da bi se postigle ciljane koncentracije lijeka u krvi (Kasichayanula i sur., 2014). Kako su aleli *CYP3A5*\*6 i *CYP3A5*\*7 rijetki u populaciji, njihov utjecaj na prilagodbu doze takrolimusa zasad je istražen samo u kombinaciji s *CYP3A5*\*3, no oba alela uzrokuju nastanak nefunkcionalnog proteina pa se smatra da nje njihov utjecaj sličan onome *CYP3A5*\*3 (Wang i sur., 2014). Varijante unutar *CYP3A* obitelji dodatno reguliraju metaboliziranje lijekova tako da mijenjaju prepoznavanje supstrata ili potencijalnih inhibitora enzima (Birdwell i sur., 2015).

### 1.3.4. Učestalost polimorfizama *CYP3A*

*CYP3A5* prvi je put izoliran 1989. uzoraka humane fetalne jetre (Aoyama i sur., 1989). Znalo se da je povezan s enzimom *CYP3A4*. Iste je godine izolirana i cDNA sekvenca za taj enzim

(Schuetz i sur., 1989). 2001. otkrivena je varijanta introna 3 koja uzrokuje prerano kodiranje stop kodona i time promjenu transkripta (Kuehl i sur., 2001.; Hustert i sur., 2001). Na temelju homozigotnosti *CYP3A5\*3* alela nastala je podjela na non-ekspresore (*CYP3A5\*3/\*3*) i ekspresore (*CYP3A5\*1\*3* i *CYP3A5\*1/\*1*). *CYP3A5\*3* najčešći je alel u europskoj i azijskim populacijama, no znatno je manje zastupljen kod Afrikanaca. Pronađene su i varijante *CYP3A5\*6* i *CYP3A5\*7*, ali one su također znatno manje zastupljene kod Europljana i Azijata u odnosu na afričku populaciju (Kuehl i sur., 2001).

*CYP3A4\*1B* pojavljuje se u bjelačkoj populaciji kod 2 do 9%, no značajno više kod afričke populacije. Smatra se da postoji veza između učestalosti alela *CYP3A5\*1* i *CYP3A4\*1B* koja se naziva neravnoteža vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*, LD). To je odnos u kojem povezanost učestalosti alela dvaju lokusa (ili više) nije slučajna, nego se pojavljuje u postotku različitom od očekivanja. Polimorfizam *CYP3A5\*1* dobro je istražen i zna mu se funkcija – on pojačava ekspresiju gena, pa neki smatraju da je zbog prisutnosti *CYP3A5\*1* pogrešno došlo do zaključka oko funkcije *CYP3A4\*1B* i da on uopće ne pridonosi pojačanju ekspresije gena. (Elens i sur., 2013).

*CYP3A4\*22* u bjelačkoj populaciji iznosi 3 do 5 %, dok je kod, na primjer, azijskih populacija učestalost te varijante alela oko 1%. (Elens i sur., 2011; Wang i sur., 2011; Wang i Sadee, 2016).

**Tablica 2.** Ključne promjene, lokacije, funkcionalni efekt i kliničke korelacije za svaki promatrani polimorfizam (prema Zanger i sur., 2013)

	<b>promjena</b>	<b>lokacija</b>	<b>funkcionalni efekt</b>	<b>kliničke korelacije</b>
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>	-392A>G (rs2740574)	promotor	povećana ekspresija i aktivnost	↑ kod slučajeva raka prostate
<b><i>CYP3A4*22</i></b>	15389 C>T (rs35599367)	intron 6	smanjena ekspresija i aktivnost	↓ metabolizam simvastatina i takrolimusa
<b><i>CYP3A5*3</i></b>	6986A>G (rs776746)	intron 3	smanjena ekspresija i aktivnost	↓metabolizam i preporučene doze lijekova preferabilnog metabolizma preko CYP3A5

### 1.3.5. Klinička značajnost polimorfizama CYP3A

CYP3A5 ima 83% sličnosti aminokiselinskog slijeda s CYP3A4 enzimom, a glavna im je razlika u aktivnom mjestu enzima i pristupnim kanalima za supstrat. Time se objašnjavaju razlike u farmakokinetici i inhibiciji katalize među enzimima. Neki od lijekova koji se metaboliziraju preko CYP3A5 su takrolimus, ciklosporin, sirolimus, sakvinavir, maravirok, midazolam, vinkristin i statini. Pretpostavlja se i da je odgovoran za rezistenciju na inhibitore tirozin kinaze i paklitaksel, no ne postoje dokazi za to. Najčvršći su dokazi za klinički utjecaj genetičkih varijacija *CYP3A5* na metabolizam takrolimusa propisane smjernicama Konzorcija za kliničku implementaciju farmakogenetike (CPIC, od engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) i s PharmGKB razinom dokaza 1A. Za klinički utjecaj varijacija *CYP3A5* na imunosupresive ciklosporin i sirolimus te za sedativ midazolam vrijedi PharmGKB razina dokaza 3). Uz to, neki predlažu i utjecaj na metabolizam vinka alkaloida među koje spada i lijek za liječenje raka, vinkristin (Rodriguez-Antona i sur., 2022).

CYP3A4 i CYP3A5 izraženi su u jetrima i crijevima, pri čemu CYP3A5 prevladava u izvanjetrenim tkivima. Oba enzima uglavnom dijele supstrate i pokazuju vrlo visoku varijabilnost u aktivnosti, što je posebno bitno za lijekove – supstrate s uskom terapijskom širinom (kemoterapeutici i imunosupresivi). Prediktivni fenotip CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4*\*22 i *CYP3A5*\*3 s učestalošću je prikazan u tablici 4.

**Tablica 3.** Prediktivni fenotip CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4*\*22 i *CYP3A5*\*3 (preuzeto i prilagođeno prema Elens i sur., 2013)

<b>fenotip CYP3A</b>	<b>genotip <i>CYP3A4</i>*22</b>	<b>genotip <i>CYP3A5</i>*3</b>	<b><i>bjelačka</i> populacija*</b>	<b><i>azijatska</i> populacija*</b>	<b><i>afrička</i> populacija*</b>
<b>PM</b>	*1/*22	*3/*3	8	-	-
	*22/*22	*3/*3			
<b>IM</b>	*1/*1	*3/*3	72	50	10
	*1/*22	*1/*3	2	-	-
	*1/*22	*1/*1			
	*22/*22	*1/*1			
<b>NM</b>	*1/*1	*1/*1	18	50	90
	*1/*1	*1/*3			

*PM* – slabi metabolizator, *IM* – intermedijarni metabolizator, *NM* – normalni metabolizator;

\*učestalosti *CYP3A4*\*22 i *CYP3A5*\*3 u bijeloj, azijskoj i afričkoj populaciji, preuzeto i prilagođeno prema 1000 Genomes database (<http://www.1000genomes.org/>).

Polimorfizam *CYP3A4\*22* je, neovisno o statusu *CYP3A5\*3*, povezan s farmakokinetikom takrolimusa. Elens i suradnici predložili su definiciju statusa metabolizma na temelju dvije varijante koje bi mogle biti korištene za poboljšanje prilagodbe doze takrolimusa (tablica 3.).

Wang i suradnici u svojem su istraživanju pokazali da su pacijenti nositelji *CYP3A4\*22* gena trebali 33% niže doze takrolimusa za postizanje ciljne koncentracije lijeka u krvi u usporedbi s *CYP3A4\*1* homozigotima i prepisali su to smanjenoj jetrenoj aktivnosti koja je povezana s *CYP3A4\*22* enzimom. Prepostavili su da je razlog smanjene aktivnosti enzima promjena brzine elongacije mRNA u stanicama. Taj je učinak neovisan o statusu *CYP3A5* alela.

Neki su lijekovi podložniji metabolizmu *CYP3A4* (recimo eritromicin) dok drugi imaju veći afinitet za *CYP3A5* (takrolimus, midazolam). Pretpostavlja se da je važnost alela ovisna o enzimskom putu koji supstrat preferira. Tako bi u slučaju supstrata koji preferira metabolizam preko *CYP3A4*, polimorfizam *CYP3A4\*22* bio taj koji bi imao značajniju ulogu, dok bi u slučaju supstrata koji preferira metabolizam preko *CYP3A5*, *CYP3A5\*3* bio taj koji igra veću ulogu na brzinu metaboliziranja lijeka (Elens i sur., 2013). Takav je slučaj s takrolimusom koji preferira metabolički put preko *CYP3A5*. Zato neki smatraju da je uloga *CYP3A4\*22* manje bitna kod njegova metabolizma (Ganoci i sur., 2017).

U radu Šimičević i suradnika iz 2022. opisuje se slučaj 34-godišnjeg pacijenta koji je nakon kronične bubrežne bolesti podvrgnut transplantaciji bubrega. Pacijent je primao preporučene doze takrolimusa i ostalih lijekova i prije same transplantacije, kao i nakon. Usprkos tome, došlo je do akutnog odbacivanja organa, a razina takrolimusa u krvi bila je niža je ciljane vrijednosti sve dok pacijent nije počeo primati i više nego dvostruku količinu takrolimusa. Tek nakon transplantacije napravljeni su farmakogenetički testovi koji su pokazali da je pacijent heterozigot za *CYP3A4\*1B* i *CYP3A5\*3* (uz još neke polimorfizme *ABCB1*, *ABCC2* i *SLCO1B1* za koje se isto sumnja da bi mogli utjecati na varijabilnost odgovora na terapiju takrolimusom). Slučaj pokazuje da, iako CPIC smjernice postoje već dugi niz godina, farmakogenetički testovi još uvijek se ne rade u svim preporučenim slučajevima što dovodi do po život opasnih stanja za pacijenta koja su se lako mogla izbjeći.

#### 1.3.5.1. Kliničke smjernice za doziranje takrolimusa prema *CYP3A5*

Takrolimus je lijek prvog izbora kod transplantacije solidnih organa. Zbog uske terapijske širine i velike varijabilnosti među pacijentima, potrebno je stalno praćenje koncentracije lijeka u krvi

i individualizacija doze (de Wildt i sur., 2011). Takrolimus se metabolizira u tankom crijevu i jetri primarno preko CYP3A5 i CYP3A4 te u manjoj mjeri preko POR (Nankivell i sur., 2003; Garcia-Roca i sur., 2012; Lalan i sur., 2014). Zbog toga se preporuča da i donor i pacijent naprave genotipizaciju CYP3A5 prije transplantacije da bi se bolje pretpostavila farmakokinetika takrolimusa, no ne postoji još dovoljno dokaza u korist ove hipoteze da bi se stavila u smjernice (Chandel i sur., 2009; van Gelder i sur., 2009). Takrolimus je imunosupresiv koji se relativno često koristi u cijelom svijetu. Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, od engl. *Food and drug administration*) odobrila je takrolimus 1994. godine za primjenu nakon transplantacije jetre. Takrolimus je makrolid koji se veže na citoplazmatski proteinski receptor, FK vezujući protein 12, na T limfocitima (Kuehl i sur., 2001). Taj kompleks veže kalcineurin, prevenirajući time defosforilizaciju i nuklearnu translokaciju nuklearnog faktora aktiviranih T stanica. Tako se inhibira produkcija interleukina 2 i aktivacija T limfocita. Takrolimus je supstrat i P glikoproteina (ABCB1, MDR1), efluksnog transportera mnogih lijekova, koji je eksprimiran na raznom epitelnom i endotelnom tkivu te na limfocitima. Metabolizam prvog prolaska u crijevima i jetri uzrokuje slabu oralnu dostupnost takrolimusa, koja iznosi oko 20% (Rodriguez-Antona i sur., 2022). Danas se takrolimus koristi kod više slučajeva transplantacije solidnih organa, za liječenje glomerulonefritisa i *graft vs. host* bolesti. Zbog uske terapijske širine i interindividualne varijabilnosti, često pacijenti primaju premalu dozu zbog čega su izloženi riziku odbijanja organa, a mogu biti i predozirani što može dovesti do toksičnosti (nefrotoksičnost, hipertenzija, neurotoksičnost, hipoglikemija) (Wang i sur., 2011). Zato se radi primjenjuje terapijsko praćenje lijeka (TDM, od engl. *therapeutic drug monitoring*) (van Schaik i sur., 2002) No, iako je ono korisno za prilagodbu doze prema koncentraciji lijeka u krvi, ne daje nam nikakve informacije o inicijalnoj dozi. Smjernice propisuju ciljne koncentracije u krvi ovisno o tipu organa i vremenu proteklom od transplantacije (Rodriguez-Antona i sur., 2022).

### Kliničke smjernice za CYP3A

Već je prije spomenuto kako su CYP3A4 i CYP3A5 enzimi preko kojih se metabolizira većina lijekova, no smjernice za kliničku primjenu CPIC postoje samo za takrolimus.

Svakom alelu, s \* u nazivu, pripada zaseban genotip s najmanje jednim polimorfizmom jednog nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*). Prikaz alela u tablici.



**Tablica 4.** Prikaz odnosa fenotipa i genotipa s primjerom diplotipa (preuzeto i prilagođeno prema Birdwell i sur., 2015)

fenotip	genotip	primjer diplotipa
<b>ekstenzivni metabolizator (CYP3A5 ekspresor)</b>	nositelj dva funkcionalna alela	*1/*1
<b>intermedijarni metabolizator (CYP3A5 ekspresor)</b>	nositelj jednog funkcionalnog i jednog nefunkcionalnog alela	*1/*3, *1/*6, *1/*7
<b>spori metabolizator (CYP3A5 non-ekspresor)</b>	nositelj oba nefunkcionalna alela	*3/*3, *6/*6, *7/*7, *3/*6, *3/*7, *6/*7

Tablica prikazuje više polimorfizama, no rijetke ili *de novo* mutacije često nisu uključene u komercijalno dostupne farmakogenetičke testove. Većina genetičkih testova analizira samo prisutnost *CYP3A5*\*3 alela.

U smjernicama se koristi klasična nomenklatura prema kojoj se ekstenzivni metabolizator označava kao „normalan“ pa se tako doza ne mijenja u slučaju prisutnosti polimorfizma alela. Međutim, kod *CYP3A5* enzima i takrolimusa, za oba se ekspresora doza povećava dok se u slučaju non-ekspresora daje standardna početna doza lijeka. Razlog tome jest to što *CYP3A5* ekspresori (*CYP3A5*\*1, alel koji je po standardnoj nomenklaturi „normalan“) čine manjinu europske populacije (Birdwell i sur., 2015).

Prema smjernicama, preporuča se pacijentima koji su spori metabolizatori za takrolimus davati standardne doze lijeka. Pacijentima koji su intermedijarni ili ekstenzivni (brzi) metabolizatori, preporuča se povećavanje doze 1,5 do 2 puta, ali ne više od 0,3 mg/kg/dan, uz TDM, pazeći na rizik od arterijske vazokonstrikcije, hipertenzije i nefrotoksičnosti koje mogu biti posljedica

terapije takrolimusom. Treba još paziti i na konkomitantne lijekove, abnormalnu funkciju jetre, i prisutnost kliničkih stanja kao što je dijareja (Birdwel i sur., 2015).

Studija koju su proveli Thervet i suradnici (Thervet i sur., 2015.) pokazuje nam kako se ciljane koncentracije takrolimusa u krvi kod pacijenata s transplantiranim bubregom postižu ranije kod onih recipijenata koje su birali prema *CYP3A5* genotipu, u odnosu na kontrolnu grupu kojima su takrolimus dozirali prema tjelesnoj masi. Ekstenzivni metabolizatori dobili su dozu povećanu za 0,3 mg/kg/dan, sporim se metabolizatorima smanjila doza do 0,15 mg/kg/dan dok je kontrolna grupa dobivala 0,2 mg/kg/dan. Kod obiju grupa radili su i terapijsko praćenje lijeka. Tri dana nakon početka praćenja terapije takrolimusom, pokazalo se da je iz grupe koja je prošla genotipizaciju značajno veći broj ispitanika dostigao ciljane koncentracije lijeka u odnosu na kontrolnu grupu. No, treba spomenuti i da se s tretmanom takrolimusom počne sedam dana kasnije zbog čekanja rezultata genotipizacije, a standardno se tretman takrolimusom uvodi odmah nakon transplantacije. Tri mjeseca nakon početka terapije, među ispitivanim grupama nije bilo razlika u preživljavanju pacijenata, nefrotoksičnosti ili akutnom odbacivanju organa. Međutim, rezultati nedavno provedene meta analize, koja je obuhvaćala 21 istraživanje efekata *CYP3A5* polimorfizama, ipak su pokazali kako postoji značajno veći rizik za odbacivanje transplantata kod osoba s *CYP3A5\*1/\*1* ili *CYP3A5\*1/\*3* genotipom. Također, pacijenti s *CYP3A5\*3/\*3* genotipom (non-ekspresori) trebali su doze 1,8-2,5 puta veće doze lijeka kako bi postigli ciljane koncentracije u odnosu na ekspresore tijekom prve godine nakon transplantacije (Thervet i sur., 2015).

Usprkos svemu, trenutno ne postoje valjani dokazi koji bi inicirali da doziranje takrolimusa prilagođeno genotipu pacijenta utječe na dugotrajne kliničke ishode, ali zato postoje dokazi da ima efekta na postizanje ciljnih koncentracija takrolimusa u punoj krvi. Kod transplantacije jetre, može se dogoditi da genotip *CYP3A5* donora i primatelja organa nisu jednaki i u tom se slučaju oba genotipa moraju uzeti u obzir kod doziranja lijeka. Studija u tom području još nema dovoljno, a diskutabilno je i u kojem to trenu genotip donora dolazi do izražaja (jedni tvrde već prvi tjedan nakon transplantacije, drugi tek nakon 6 mjeseci) (Muraki i sur., 2011; Fukudo i sur., 2008; Li i sur., 2007; Wei-lin i sur., 2006; Yu i sur., 2006). Zbog manjka studija i nekonzistentnosti rezultata, smjernice postoje samo za transplantaciju bubrega, srca, pluća, hematopoetskih matičnih stanica te za pacijente s transplantiranom jetrom kada je genotip donora i recipijenta identičan (Ji i sur., 2012).

Što se tiče pedijatrijske populacije, istraživanja ima još manje, nego za odraslu populaciju. Općenito, kod pacijenata s transplantiranim bubregom, korigirane koncentracije takrolimusa su 1,5-2 puta veće za genotip *CYP3A5*\*3/\*3 u usporedbi s pacijentima s genotipom *CYP3A5*\*1/\*1 ili \*1/\*3 do godinu dana nakon transplantacije (de Wildt i sur., 2012; Zhao i sur., 2011). Ipak, treba uzeti u obzir ostalu terapiju koju pacijent prima kao i dob, koje također pridonose varijabilnosti doze takrolimusa kod djece. Tako djeca pubertetske dobi (više od 12 godina) s transplantacijom bubrega trebaju veće korekcije doze (više doze lijeka) od mlađe djece tijekom prva dva tjedna ili do godinu dana nakon transplantacije (de Wildt i sur., 2012; Ferraris i sur., 2011; Lalan i sur., 2014; Kausman i sur., 2008). Osim toga, za djecu i adolescente s najmanje jednim *CYP3A5*\*1 alelom, preporuča se 1,5 do 2 puta veća doza takrolimusa, kao i za odrasle. Za liječnike su dostupne online tablice i ostali alati s izračunatim prilagođenim dozama takrolimusa ovisno o genotipu (Birdwell i sur., 2015).

U obzir treba uzeti i neke lijekove. Posebno treba pažnju obratiti na nedihidropirimidinske blokatore kalcijevih kanala i azolne antimikotike koji se često propisuju transplantacijskim pacijentima. Osim samih lijekova, post i dijareja mogu utjecati djelujući na apsorpciju takrolimusa (Kausman i sur., 2008; Kuypers i sur., 2008). Literaturno su opisani utjecaji *CYP3A4*\*22, *POR*\*28, *PPAR alfa* i *ABCB1* na metabolizam takrolimusa, no nije poznato na koji način utječu. Ključni problem kod predviđanja klirensa takrolimusa *in vivo* je to što se ne može odrediti koliki je relativni utjecaj *CYP3A4* u odnosu na *CYP3A5*. Utjecaj *CYP3A4* na varijaciju takrolimusa mogao bi biti veći kod pacijenata non-ekspresora *CYP3A5* zbog potpunog gubitka metaboličke funkcije *CYP3A5*\*3 alela. Osim što kod transplantacije bubrega farmakokinetika takrolimusa ovisi o *CYP3A5* genotipu donora, on zajedno s *ABCB1* genotipom može utjecati na vjerojatnost nefrotoksičnosti takrolimusa (Moore i sur., 2012).

*CYP3A5* genotipizacija ne može zamijeniti terapijsko praćenje lijeka jer i ostali faktori poput demografskih faktora, lijek-lijek interakcija i genetičkih varijacija utječu na farmakodinamiku takrolimusa. Može se dogoditi i krivo tumačenje genetskog testiranja ili pogreška u genotipizaciji što bi dovelo do predoziranja pacijenta takrolimusom (Thervet i sur., 2010).

Dakle, u obzir treba uzeti nekoliko kliničkih faktora:

- 1) konkomitantna terapija,
- 2) varijacije u ostalim genima, osim *CYP3A5* koji mogu utjecati na farmakokinetiku,
- 3) farmakodinamička varijabilnosti između pojedinaca,

- 4) to što još nisu definirane genetičke osnove učinkovitosti i toksičnosti takrolimusa,
- 5) to što doziranje takrolimusa temeljeno na genotipizaciji CYP3A5 još ne djeluje dokazano na poboljšanje učinkovitosti ili smanjenje toksičnosti takrolimusa,
- 6) praćenje koncentracije takrolimusa u krvi tijekom tretmana (Birdwell i sur., 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Enzimi potporodice citokroma P450 3A (CYP3A) sudjeluju u metabolizmu oko 50% lijekova u kliničkoj primjeni. Najvažniji su enzimi CYP3A4 i CYP3A5, za koje je karakteristična interindividualna varijabilnost i često preklapanje supstrata. Najbolji klinički primjer je takrolimus, lijek prvog izbora kod transplantacije solidnih organa s uskom terapijskom širinom, koji se metabolizira preko enzima CYP3A4 i CYP3A5. Geni ovih enzima vrlo su polimorfni, što ima za posljedicu veliku interindividualnu varijabilnost u njihovoj aktivnosti. Upravo je u tome farmakogenetički značaj enzima sustava CYP3A jer utječu na farmakokinetiku takrolimusa te brojnih drugih lijekova. Genetičke varijante mogu objasniti dio varijabilnosti aktivnosti CYP3A. Klinički najvažnije su varijante *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*22*. U Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pacijenti se testiraju na prisutnost polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* te je moguća genotipizacija prije početka terapije takrolimusom i kod nuspojava i/ili neučinkovitosti lijekova koji su supstrati CYP3A. Ovaj će rad prikazati učestalost alela i genotipova polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji prema podacima iz postojećih rutinskih analiza.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici i uzorci

U istraživanje je bilo uključeno 258 ispitanika za *CYP3A4\*1B* (rs2740574), 1100 za *CYP3A4\*22* (rs35599367) i 440 za *CYP3A5 \*3* (rs776746). Raspon godina iznosi od 19 do 89. Zbroj ispitanika na svaki polimorfizam ne čini ukupan broj ispitanika jer nisu svi ispitivani na samo taj jedan polimorfizam, nego se neki pacijenti preklapaju.

Metoda koja se koristi za određivanje prisutnosti polimorfizama enzima CYP sustava jest TaqMan<sup>®</sup> metoda PCR u stvarnom vremenu. Prije same lančane reakcije polimeraze, moramo izolirati DNA iz našeg uzorka pune krvi. Zato ću prvo opisati postupak izolacije DNA iz uzorka krvi, zatim načelo lančane reakcije polimeraze (PCR), a naposljetku i lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu, odnosno *Real-Time* PCR, koja se koristi kod genotipizacije *CYP3A4* i *CYP3A5* enzima.

Primarni je uzorak puna krv uzeta na epruvetu s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Kao sekundarni uzorak rabi se otopina DNA u TE puferu.

#### 3.2. Izdvajanje DNA metodom QIAmp

##### **Načelo metode**

QIAamp DNA Mini i QIAamp DNA Blood Mini komercijalno dostupni kitovi omogućavaju nam brzu i jednostavnu izolaciju ukupne DNA iz uzorka koja je pogodna za korištenje kod PCR metode i metode Southern Blot. Uzorak mogu biti plazma, serum, puna krv, leukocitni sloj (buffy coat), koštana srž, tjelesne tekućine i izljevi, limfociti, kulture stanica i tkiva, a za genotipizaciju je primarni uzorak puna krv. Pogodni uzorci su krvi uzete na citrat, heparin ili EDTA. Izolacija pomoću QIAmp metode omogućava nam da dobijemo izoliranu DNA već za 20-ak minuta, a izolat ne sadrži proteine, nukleaze kao ni ostale kontaminante ili inhibitore. Izdvojena DNA sastoji se od fragmenata duljine do 50 kilobaza, a dominiraju fragmenti duljine 20 do 30 kilobaza. Kit je dizajniran tako da možemo dobiti otprilike 6 µl ukupne DNA iz 200 µl pune humane krvi.

### **Potrebna oprema i reagensi**

- pipeta (automatska) i odgovarajući sterilni nastavci volumena 10-100  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- pipeta (automatska) i odgovarajući sterilni nastavci volumena 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- mikroeprevete volumena 1,5 i 2 ml (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Njemačka)
- termostat Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka)
- komplet reagenasa za izdvajanje QIAamp® DNA Blood Mini Kit – Qiagen (Qiagen, Njemačka) (pohranjuje se na sobnoj temperaturi 15-25 °C najmanje 12 mjeseci, a za čuvanje duže od 12 mjeseci liofiliziranu QIAGEN Protease treba pohraniti na 2-8 °C)
- 96-100 % etanol

### **Priprema reagensa**

Najprije se priprema QIAGEN Protease, ovisno o tome koju vrstu kompleta koristimo:

- Za QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)– liofilizat QIAGEN Protease otopiti u 1,2 mL pufera AW2
- Za QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)– liofilizat QIAGEN Protease otopiti u 5,5 mL pufera AW2

### **Priprema pufera**

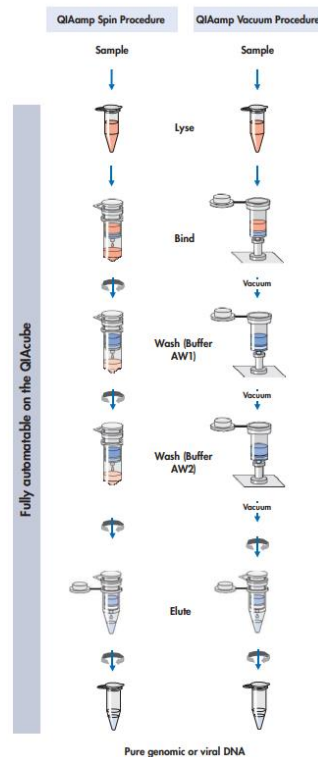
Kit sadrži pufer: AW1, AW2, AL i AE

AL pufer potrebno je dobro protresti prije upotrebe. Prije prve upotrebe AW1 i AW2 pufera, u bočicu s koncentratom treba dodati 96-100 % etanola (što i piše na samoj bočici).

### **Postupak**

1. Pipetirati 20  $\mu\text{l}$  QIAGEN proteaze (ili proteinaze K) u mikroeprevetu (1,5 ml).
2. Dodati 200  $\mu\text{l}$  uzorka (u ovom slučaju pune krvi).
3. Dodati 200  $\mu\text{l}$  AL pufera i miješati pomoću vrtložne mješalice 15 sekundi. Dobro promiješati smjesu jer će se liza efikasno provesti samo je reakcijska smjesa homogena.
4. Inkubirati na 56°C 10 minuta.
5. Kratko centrifugirati epruveta s reakcijskom smjesom pomoću mikrocentrifuge kako bi se uklonile kapljice s poklopca i stijenki.
6. Dodati 200  $\mu\text{l}$  etanola (96-100 %) i ponovo miješati vrtložnom mješalicom 15 sekundi.
7. Nakon miješanja, epruvete s uzorcima ponovo centrifugirati kako bismo uklonili kapljice s poklopca i stijenki.

8. Smjesu pažljivo preseliti u QIAamp Mini spin kolone (bez dodirivanja rubova i poklopca) koje smo prethodno stavili u čiste mikroepruvete volumena 2 ml .
9. Zatvoriti poklopce i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm) jednu minutu.
10. Premjestiti QIAamp Mini spin kolone u druge čiste mikroepruvete volumena 2 ml
11. Pažljivo otvoriti QIAamp Mini spin kolone i dodati 500 µl AW1 pufera
12. Zatvoriti poklopce i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm) jednu minutu
13. Premjestiti kolone u čiste mikroepruvete volumena 2 ml .
14. Dodati 500 µl AW2 pufera u QIAamp Mini spin kolone, bez dodirivanja rubova.
15. Zatvoriti poklopce i centrifugirati na 20 000 g, odnosno 14 000 rpm 3 minute.
16. Premjestiti kolone u čiste mikroepruvete volumena 2 ml.
17. Centrifugirati na 20 000 g, odnosno 14 000 rpm jednu minutu.
18. Premjestiti kolone u čiste mikroepruvete volumena 1,5 ml.
19. Pažljivo otvorite poklopce i dodati 200 µl AE pufera ili destilirane vode.
20. Inkubirati na sobnoj temperaturi (15–25°C) jednu minutu.
21. Centrifugirati na 6000 g (8000 rpm) jednu minutu.



**Slika 4.** Prikaz izolacije DNA pomoću QIAamp DNA Mini Blood kita (preuzeto i prilagođeno prema QIAGEN, 2016)



### 3.2.1. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Mjerenje koncentracije DNA radimo pomoću spektrofotometra. Koncentracija se izračunava na osnovu optičke gustoće otopine (engl. *optical density*, OD) pri valnoj duljini od 260 nm. DNA najčešće razrjeđujemo puferom FG3 u omjeru 1:100. OD=1 odgovara približno 50 µg/mL dvolančane DNA pa vrijedi:

$$\text{Konc. DNA (}\mu\text{g/mL)} = \text{OD}_{260} \times \text{razrjeđenje}(100) \times 50$$

I čistoća DNA određuje se mjerenjem optičke gustoće, ali pri dvjema valnim duljinama - od 260 i 280 nm. Ako je omjer apsorbancija  $A_{260} / A_{280}$  od 1,7-1,9, tada je naša izolirana DNA visoke čistoće, odnosno ne sadrži proteine.

I koncentracija i čistoća DNA određuje se pomoću NanoDrop 2000 spektrofotometra (ThermoFischer Scientific, Njemačka).

### 3.3. Genotipizacija *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* TaqMan<sup>®</sup> metodom

#### **Lančana reakcija polimerazom**

PCR kratica je od engleskog *Polymerase Chained Reaction*, a označava lančanu reakciju polimerazom. To je enzimski posredovan proces tijekom kojeg se specifični dio slijeda DNA replicira opet iznova da bismo dobili značajno veću količinu DNA u uzorku s kojom onda možemo dalje raditi analize. Metoda koristi princip hibridizacije komplementarnih lanaca nukleinskih kiselina zajedno s replikacijom lanaca nukleinskih kiselina tijekom većeg broja ciklusa. Ova nam metoda omogućava da iz jedne kopije cijanog slijeda nukleinske kiseline dobijemo do  $10^7$  (pa čak i više od toga) kopija nukleinske kiseline u relativno kratkom vremenskom periodu. (<https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>).

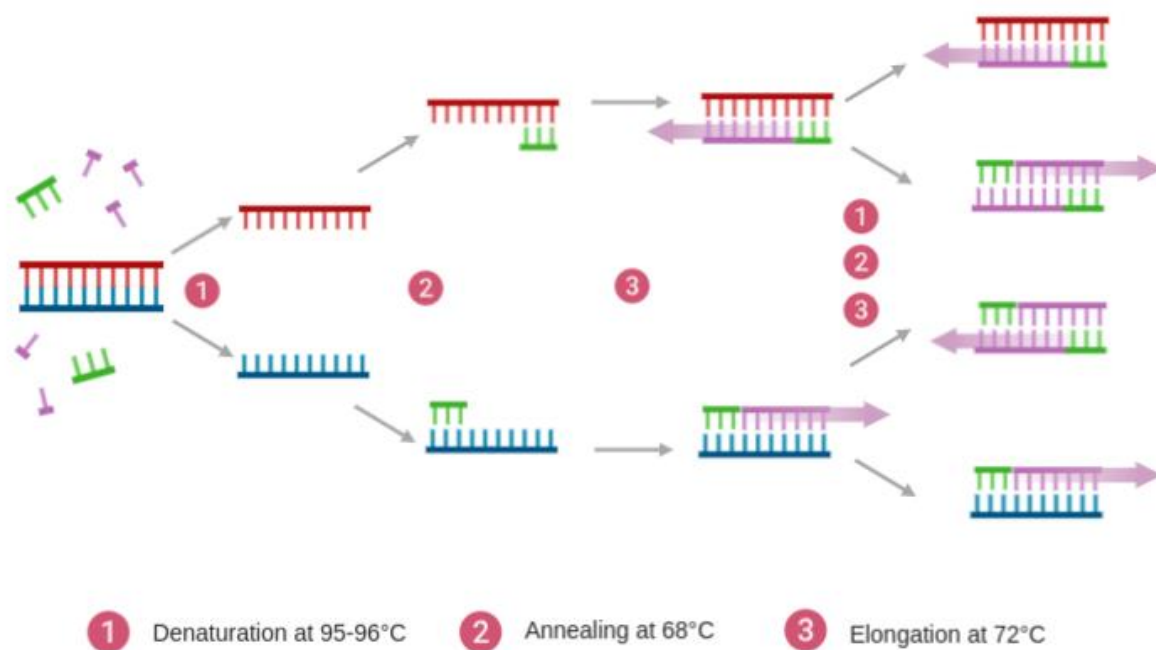
Najprije je potrebno izolirati DNA iz uzorka. Taj je dio već opisan. Slijedi amplifikacija ciljne DNA sekvence.

PCR reakcijska smjesa mora sadržavati:

1. izoliranu ciljnu DNA
  - ona služi kao kalup za reakciju,
2. sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP)
  - služe kao gradivni materijal za sintezu novih DNA lanaca i u reakcijskoj smjesi moraju biti prisutni u suvišku,
3. termostabilnu DNA-polimerazu (Taq-polimerazu)
  - Taq-polimerazi optimalna je temperatura za djelovanje 72°C, i zato može djelovati pri denaturacijskim uvjetima, za razliku od većine drugih polimeraza, koje bi nepovratno izgubile aktivnost
  - polimeraza ne može sintetizirati novi lanac ispočetka, nego se mora vezati na već postojeći oligonukleotidni slijed i zato trebamo:
4. dvije specifične početnice (eng. primer)
  - to su sintetski dobivene oligonukleotidne sekvence duljine 10 - 25 nukleotida komplementarne 3' i 5' krajevima DNA fragmenta koji želimo umnožiti
  - na njih će se vezati polimeraza,
5. Mg<sup>2+</sup> ione
  - magnezij je kofaktor DNA-polimeraze i održava stabilnost i optimalni naboj dNTP-a,
6. pufer
  - služi kao medij u kojem će se reakcija odvijati

PCR najčešće radimo u 25 do 30 ponavljajućih ciklusa, a svaki ciklus ima tri faze:

1. Denaturacija ciljanog slijeda nukleinske kiseline (96 °C)
  - dvolančane DNA (dsDNA, od engl. double-stranded DNA), razdvajaju se pod utjecajem temperature na dva jednolančana lanca (ssDNA, od engl. single stranded DNA)
2. Hibridizacija početnica i jednolančanih ciljnih nukleinskih kiselina (50 – 60 °C)
  - hlađenjem smjese na 50 – 60 °C, omogućava se specifično vezanje početnica i njima komplemetarnih sekvenci jednolančane DNA
3. Elongacija ili produljenje DNA lanaca (72 °C)
  - Reakcijska smjesa se zagrijava na 72 °C čime je postignuta optimalna temperatura djelovanja Taq-polimeraze i ona sad sintetizira komplementarni lanac, nastavno na početnice



**Slika 5.** Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom (preuzeto i prilagođeno prema <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c8c7ba9d4f2ef3300632942/t-5cf004269cf1ff003377d8cd-polymerase-chain-reaction-pcr>)

Po završetku reakcije, provjeravamo je li zbilja došlo do umnažanja našeg ciljnog slijeda DNA. U tu svrhu najčešće se primjenjuje elektroforeza na agaroznom gelu. Amplificirani DNA lanci migriraju u elektroforetskom polju ovisno o veličini DNA molekula (budući da su svi jednako negativno nabijeni) i tvore vrpce na gelu koje se mogu vizualizirati i usporediti sa standardom koji sadrži fragment iste dulje kao što je ciljane sekvence DNA (<https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>).

## PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR*)

### Načelo metode

Otkrivanje i analiza polimorfizama jednog nukleotida, odnosno SNP-ova (engl. *single nucleotide polymorphism*) za što koristimo TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay (TaqMan® DME). Test koristi specifične početnice i TaqMan® fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe na kojima, zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze, dolazi do stvaranja fluorescentnog signala. Princip reakcije *real-time* PCR-a isti je kao i kod obične

PCR reakcije, samo što na kraju reakcije ne provjeravamo elektroforezom na gelu jesmo li dobili umnoženu DNA, nego se nastanak produkta reakcije prati tijekom reakcije u stvarnom vremenu. Reakcija se odvija u uređaju za PCR u stvarnom vremenu koji ima kameru ili detektor za praćenje reakcije. Postoji još tehnika za praćenje, osim pomoću TaqMan® tehnologije, ali kod svih se tehnika nastanak novog lanca DNA povezuje s nastankom fluorescentnog signala koji se detektira tijekom PCR ciklusa.

### Amplifikacija

Kao što je spomenuto, princip je isti kao i kod obične PCR reakcije.

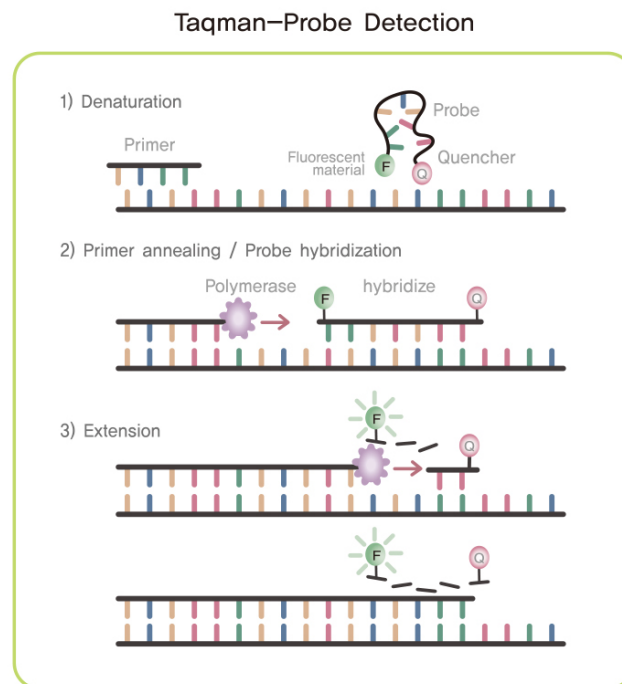
1. Denaturacija ciljanog slijeda nukleinske kiseline (96 °C)
  - dvolančane DNA (dsDNA, od engl. *double-stranded DNA*), razdvajaju se pod utjecajem temperature na dva jednolančana lanca (ssDNA, od engl. *single stranded DNA*)
2. Hibridizacija početnica i jednolančanih ciljnih nukleinskih kiselina (engl. *annealing*) (50 – 60 °C)
  - hlađenjem smjese na 50 – 60 °C, omogućava se specifično vezanje početnica i njima komplemetarnih sekvenci jednolančane DNA
3. Elongacija ili produljenje DNA lanaca (72 °C)
  - Reakcijska smjesa se zagrijava na 72 °C čime je postignuta optimalna temperatura djelovanja Taq-polimeraze i ona sad sintetizira komplementarni lanac, nastavno na početnice

### Detekcija TaqMan® tehnologijom

Detekcija se temelji na fluorescentnoj tehnologiji. Sa svakom amplifikacijom dolazi do pojave fluorescentnog signala koji se bilježi detektorom. Detektor šalje digitalni signal do računala i pomoću računalnog sustava signali se analiziraju.

TaqMan® je zapravo sonda koja nosi reportersku boju (reporter), često fluorescein (FAM) na svojem 5' kraju, i prigušivač (engl. *quencher*) karboksitetrametilrodamin (TAMRA), pričvršćen na 3' kraj oligonukleotida. Sonde su, u normalnim uvjetima, vezane same za sebe i prigušivač je tako blizu reportera i prigušuje fluorescentni signal. Sonde su sintetizirane tako da sadrže regiju koja je homologna ciljnoj sekvenci DNA i kada pomiješamo uzorak DNA s

TaqMan sondama, one hibridiziraju. Reporter i prigušivač su i dalje blizu i ne dolazi do pojave fluorescentnog signala. Kako kreću ciklusi PCR reakcije, Taq-polimeraza počinje sintetizirati novi DNA lanac i svojom 5'endonukleaznom aktivnošću razlaže TaqMan® sonde koje su hibridizirale s lancem kalupom. Prigušivač više nije blizu reportera i ne utišava fluorescentni signal. Detektor bilježi fluorescentni signal i sa svakim se ciklusom bilježi porast fluorescencije, što nam označava porast broja amplificiranih DNA lanaca (<https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>).



**Slika 6.** Metoda TaqMan® PCR u stvarnom vremenu (preuzeto i prilagođeno prema <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>)

## Potrebna oprema i reagensi

### Oprema:

- uređaj za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (Applied Biosystems, SAD)
- pipeta (automatska) sa sterilnim nastavcima volumena 0.5 – 10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- pipeta (automatska) sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)

- pipeta (automatska) sa sterilnim nastavcima volumena 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena: 0.2, 0.5 i 1.5-2.0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom ili „strip“ mikroeprovete s poklopcima (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete (Applied Biosystems, SAD)
- vrtložna miješalica V-1 plus (Biosan, Latvija)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Eppendorf 5804R / 5810R (Eppendorf, Njemačka)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)

## Reagensi

Reagense treba čuvati na temperaturi od 2°C do 8 °C, i -15°C do -25°C. Treba izbjegavati prečesto zamrzavanje i odmrzavanje) TaqMan® DME Assay Mix-a i gotove reakcijske smjese (preporuča se maksimalno 3 puta ili napraviti alikvote). Izbjegavati treba i izlaganje direktnom svjetlu!

Reagensi:

- TaqMan® Universal PCR Master Mix
- TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay
- TaqMan® SNP Genotyping Assays *CYP3A4\*22*
- TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay *CYP3A5\*3*

**Tablica 1.** Prikaz alela, SNP, nukleotidne promjene i TaqMan® reagensa (preuzeto i prilagođeno prema TaqMan® protokolu)

Gen, alel	db SNP*	nukleotidna promjena**	TaqMan® Assay ID
<i>CYP3A4*1B</i>	rs2740574	c. -392G>A	C___1837671_50
<i>CYP3A4*22</i>	rs35599367	c.522-191C>T (intron 6)	C_59013445_10
<i>CYP3A5 *3</i>	rs776746	c.219-237A>G (g. 6986 A>G)	C__26201809_30

\* *Single Nucleotide Polymorphism Database*  
 \*\* *The Pharmacogene Variation (PharmVar)*

## Postupak

Kontrole: koriste se pozitivna kontrola za *wt* (divlji tip) i pozitivna kontrola za *het* (heterozigot) ili *mut* (mutirani tip), i negativna kontrola (NTC, od engl. *no template control*).

Same specifikacije izvedbe, odnosno upute proizvođača TaqMan® SNP Genotyping Assays mogu se naći na sljedećoj poveznici: [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593\\_TaqManSNP\\_UG.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf) Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu priprema se prema tablici 5. Potrebno je pripremiti razrjeđenja DNA i reagense, otopimo ih na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetlosti.

**Tablica 2.** Prikaz sastava reakcijske smjese za TaqMan® PCR u stvarnom vremenu

reakcijska smjesa - sastojci	volumen (µl)	koncentracija u reakcijskoj smjesi
<b>TaqMan® Universal PCR Master Mix</b>	5.0	1x
<b>TaqMan® DME Assay Mix</b> *, 20x <b>TaqMan® SNP Assay Mix</b> *, 20x	0.5	1x
<b>DNA razrjeđenje</b>	4.5	1-20 ng
<b>ukupni volumen reakcijske smjese</b>	<b>10</b>	

\*za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući TaqMan® DME Assay

Daljnji postupak:

- reagense lagano promiješati pomoću vrtložne miješalice
- centrifugirati 3 do 5 sekundi na 3000 rpm u mikrocentrifugi kako bi se sadržaj bočica spustio na dno
- pipetirati TaqMan® Universal PCR Master Mix i TaqMan® Assay u mikroeprevetu, zatim lagano prstom protresti mikroeprevetu i centrifugirati 3 do 5 sekundi

- reakcijske smjese pipetirati na mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete
- pipetirati u reakcijske smjese DNA uzorke, kontrolne uzorke i negativne kontrole
- zatvoriti mikrotitarske pločice pokrovnom folijom, odnosno „strip“ mikroeprovete odgovarajućim poklopcima te centrifugirati u centrifugi 3 do 5 sekundi na 3000 rpm
- uzorke staviti na uređaj ABI 7500 i pokrenuti program koji nam treba – alelnu diskriminaciju ili amplifikaciju (u tablici 4. navedene razlike među programima)
- po završetku programa očitavamo rezultat

**Tablica 3.** Prikaz faza ciklusa lančane reakcije polimeraze

PCR – 50 ciklusa				
pre-PCR read	inicijacija	denaturacija	amplifikacija	post-PCR read
temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje
60 °C / 1 min	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	95 °C / 15 s	60 °C / 90 s	60 °C / 1 min

### Načelo postupka

Kod amplifikacije nekog ciljnog slijeda DNA koristimo početnice specifične za taj slijed i dvije TaqMan® fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe za detekciju alela. Jedna se proba veže za divlji tip, a druga za mutirani tip alela. Probe su takve da sadrže:

- reporter boja VIC® ili FAM® na 5' kraju svake probe
- nefluorescentni prigušivač boje na 3' kraju probe

Proba, dakle, ima fluorescentnu boju, no, kako se na drugom kraju probe nalazi prigušivač, nema fluorescentnog signala. Početnica i TaqMan® probe tijekom PCR reakcije vežu se na ciljni slijed DNA i Taq polimeraza produžuje početnice te svojom egzozonukleaznom aktivnošću cijepa probe koje su hibridizirane na ciljni slijed DNA. Time se prigušivač i reporterska boja odvajaju i dolazi do emisije fluorescencije reporterske boje. Taj se signal detektira i analizira pomoću računalnih programa 7500 Fast Software v2.0.6 ili 7500 Fast Software v.2.3.

Načelo vrijedi općenito za analizu svakog polimorfizma, a za analizu *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5 \*3* koriste se:



Za *CYP3A4\*1B*:

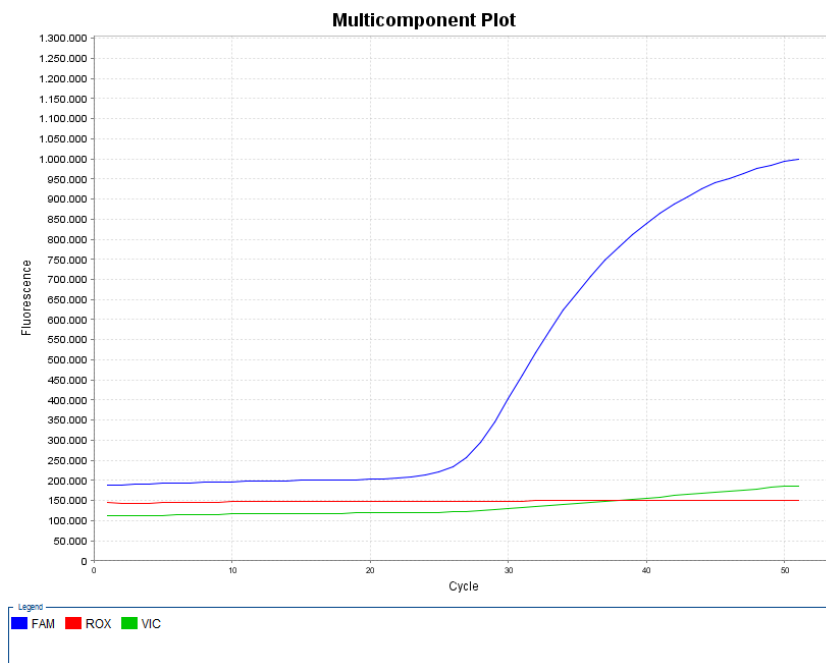
- fluorescentni signal FAM® ukazuje na prisutnost alela divljeg tipa *CYP3A4 \*1*
- fluorescentni signal VIC® ukazuje na prisutnost polimorfnog alela *CYP3A4 \*B*

Za *CYP3A4\*22*:

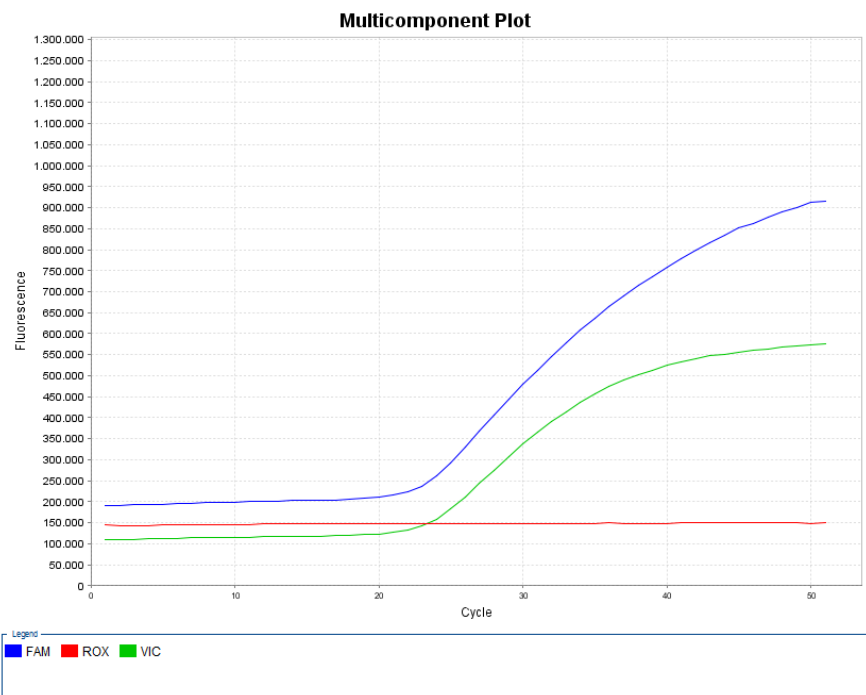
- fluorescentni signal VIC® ukazuje na prisutnost alela divljeg tipa *CYP3A4 \*1*
- fluorescentni signal FAM® ukazuje na prisutnost polimorfnog alela *CYP3A4\*22*

Za *CYP3A5 \*3*:

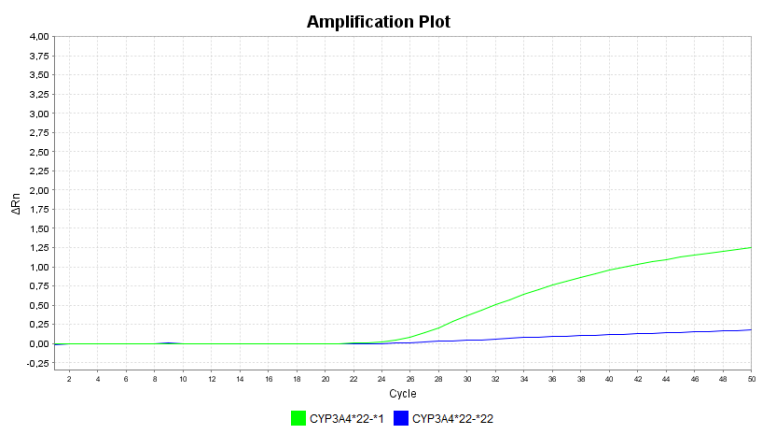
- fluorescentni signal VIC® ukazuje na prisutnost alela divljeg tipa *CYP3A5 \*1*
- fluorescentni signal FAM® ukazuje na prisutnost polimorfnog alela *CYP3A5 \*3*



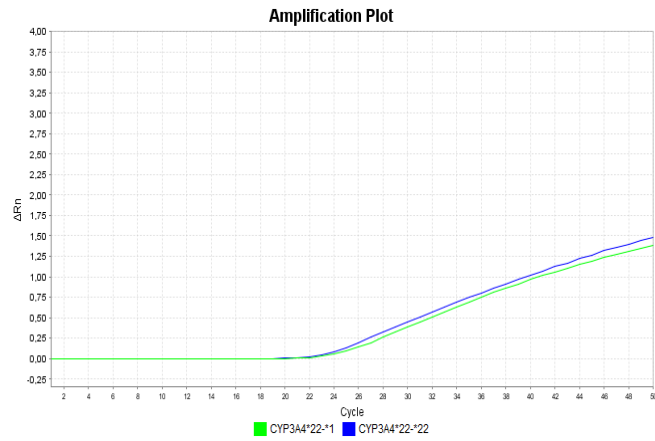
**Slika 7.** Multicomponent Plot - prisutnost samo fluorescentnog signala FAM® – homozigot *CYP3A4 \*1/\*1*



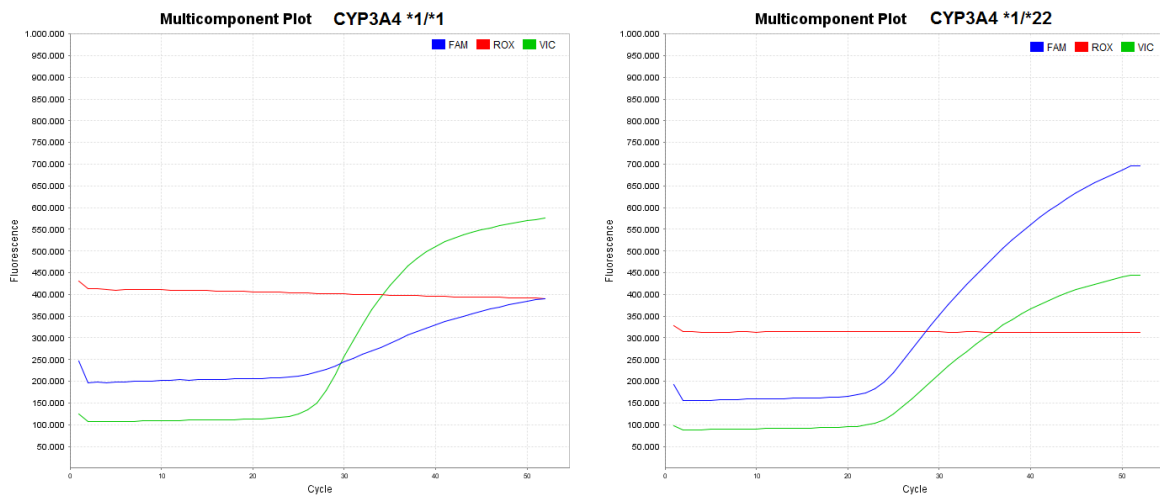
**Slika 8.** Multicomponent Plot - prisutnost oba fluorescentna signala VIC® i FAM® - heterozigot *CYP3A4* \*1/\*1B



**Slika 9.** Amplification Plot - prisutnost samo fluorescentnog signala VIC® – homozigot *CYP3A4* \*1/\*1

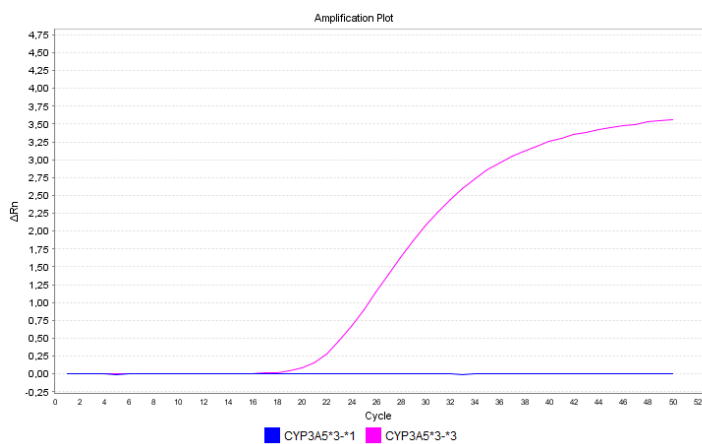


**Slika 10.** Amplification Plot - prisutnost oba fluorescentna signala VIC® i FAM® - heterozigot CYP3A4 \*1/\*22

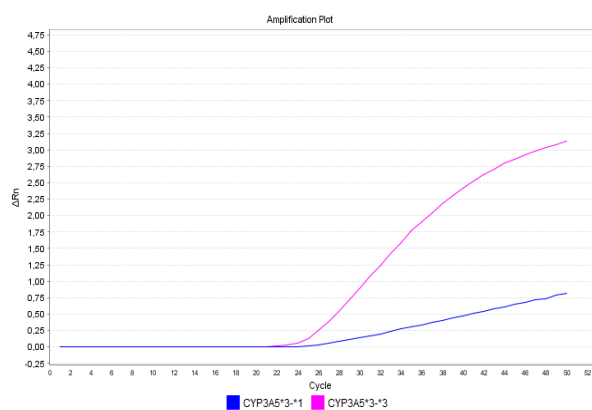


**Slika 11.** Multicomponent Plot - VIC® i FAM® specifične krivulje za CYP3A4\*1/\*1 i CYP3A4\*1/\*22

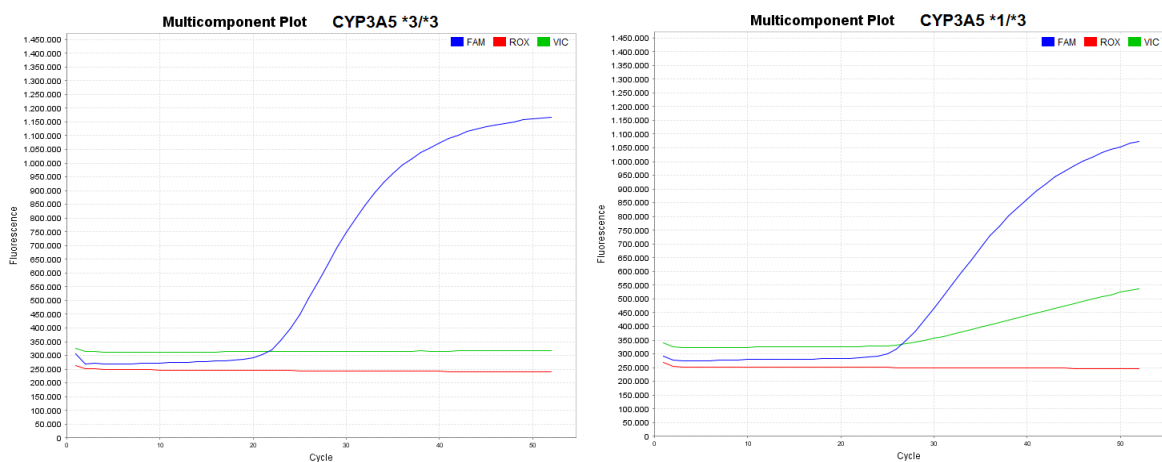
**CYP3A5 \*3**



**Slika 12.** Amplification Plot - prisutnost samo fluorescentnog signala FAM® - homozigot CYP3A5 \*3/\*3



**Slika 13.** Amplification Plot - prisutnost oba fluorescentna signala VIC® i FAM® - heterozigot CYP3A5 \*1/\*3



**Slika 14.** Multicomponent Plot - VIC® i FAM® specifične krivulje za CYP3A5 \*3/\*3 i CYP3A5 \*1/\*3

### 3.4. Statistička obrada podataka

Učestalost alelnih varijanti polimorfizama *CYP3A5* \*3, *CYP3A4*\*1B i *CYP3A4*\*22 određena je direktnim brojanjem. Varijable deskriptivne statistike rezultata obrađene su uz uporabu programa Microsoft Excel 2013.

## 4. REZULTATI

Rezultati statističke obrade podataka o učestalosti alela i genotipova polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* pacijenata KBC-a Zagreb genotipiziranih tijekom 8 godina prikazani su u tablicama u nastavku. Prikazani su i rezultati za učestalost tih istih polimorfizama u Europi i svijetu preuzeti iz baza podataka *GnomAD* i *1000 Genomes database*.

### 4.1. Učestalost alela i genotipova polimorfizma *CYP3A4\*1B*

Ispitivanje polimorfizma *CYP3A4\*1B* napravljeno je kod 258 ispitanika i pokazalo se da 86,43% ispitanika ima genotip *\*1/\*1*, 13,18% ima genotip *\*1/\*1B*, a 0,39% ima genotip *\*1B/\*1B*.

**Tablica 7.** Prikaz učestalosti alela i genotipova polimorfizma *CYP3A4\*1B* u hrvatskoj populaciji

<i>CYP3A4*1B</i>	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*1B</i>	<i>*1B/*1B</i>	ukupno	broj alela	ukupni broj alela	učestalost alela	učestalost alela (%)
broj ispitanika	223	34	1	258				
	0,86434	0,13178	0,00388	1				
% ispitanika	<b>86,43</b>	<b>13,18</b>	<b>0,39</b>	100				
broj alela								
<i>CYP3A4 *1</i>	446	34	0		480	516	0,9302326	<b>93,02</b>
<i>CYP3A4*1B</i>	0	34	2		36	516	0,0697674	<b>6,98</b>
					516			100

Dalje su u tablicama prikazane učestalosti genotipova *CYP3A4\*1B* u Europi i u svijetu.

**Tablica 4.** Prikaz učestalosti genotipova *CYP3A4\*1B* u Europi (preuzeto i prilagođeno prema [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99783973-99784973;v=rs2740574;vdb=variation;vf=730033313](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99783973-99784973;v=rs2740574;vdb=variation;vf=730033313) )

Gen - alel	Genotip	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup> Europljani (ukupno)	CEU <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	GBR <sup>b</sup>	IBS <sup>b</sup>	TSI <sup>b</sup>
<i>CYP3A4 *1B</i> (rs2740574)	<i>*1/*1</i>	<b>0.864</b> (223)	0.946 (476)	0.970 (96)	0.939 (93)	0.934 (85)	0,944 (101)	0,944 (101)
	<i>*1/*1B</i>	<b>0.132</b> (34)	0.052 (26)	0.030 (3)	0.051 (5)	0.066 (6)	0,056 (6)	0,056 (6)
	<i>*1B/*1B</i>	<b>0.004</b> (1)	0.002 (1)	0	0.010(1)	0	0	0

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup> Učestalosti alela prikupljene iz baze podataka 1000 Genoma

CEU – stanovnici Utaha porijeklom iz sjeverne i zapadne Europe iz podataka CEPH; FIN –Finci u Finskoj; GBR –Britanci u Engleskoj; IBS – iberijska populacija; TSI – Toskanci u Italiji

**Tablica 9.** Prikaz učestalosti alela *CYP3A4\*1B* u svijetu (preuzeto i prilagođeno prema [https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99382096-C-T?dataset=gnomad\\_r2\\_1](https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99382096-C-T?dataset=gnomad_r2_1))

NCBI dbSNP ID	Aleli	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	AFR <sup>b</sup>	EAS <sup>b</sup>	SAS <sup>b</sup>	AMR <sup>b</sup>	AJ <sup>b</sup>	Ostali <sup>b</sup>
<i>CYP3A4*1B</i> (rs2740574)	*1	<b>0.9302</b>	0.9616	0.9625	0.3556	0.9987	0	0.9161	0.9448	0.9020
	*1B	<b>0.0698</b>	0.0384	0.0375	0.6444	0.0013	1	0.0839	0.0552	0.098

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup> Podaci preuzeti iz baze podataka The Genome Aggregation Database (gnomAD)

EUR – Europljani (osim Finaca); FIN – Finci; AFR – Afrikanci/Afroamerikanci; EAS – istočna Azija; SAS – Južna Azija; AMR – Latino i miješani Amerikanci; AJ – Aškenazi židovi

#### 4.2. Učestalost alela i genotipova polimorfizma *CYP3A4\*22*

Ispitivanje genotipa za polimorfizam *CYP3A4\*22* napravljeno je kod 1100 ispitanika i pokazalo se da 93,09% ispitanika ima genotip \*1/\*1, 6,73% ima genotip \*1/\*22, a 0,18% ima genotip \*22/\*22.

**Tablica 10.** Prikaz učestalosti alela i genotipova polimorfizma *CYP3A4\*22* u hrvatskoj populaciji

<i>CYP3A4*22</i>	*1/*1	*1/*22	*22/*22	ukupno	broj alela	ukupni broj alela	učestalost alela	učestalost alela (%)
<b>broj ispitanika</b>	<b>1024</b>	<b>74</b>	<b>2</b>	1100				
	0,93091	0,06727	0,00182	1				
<b>% ispitanika</b>	<b>93,09</b>	<b>6,73</b>	<b>0,18</b>	100				
<b>broj alela</b>								
<i>CYP3A4*1</i>	2048	74	0		2122	2200	0,9645455	<b>96,45</b>
<i>CYP3A4*22</i>	0	74	4		78	2200	0,0354545	<b>3,55</b>
					2200			100

Dalje su u tablicama prikazane učestalosti genotipova *CYP3A4\*22* u europskim populacijama i ostalim populacijama u svijetu.

**Tablica 11.** Prikaz učestalosti genotipova *CYP3A4\*22* u Europi (preuzeto i prilagođeno prema [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99768193-99769193;v=rs35599367;vdb=variation;vf=733872089](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99768193-99769193;v=rs35599367;vdb=variation;vf=733872089) )

Gen - alel	Genotip	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup> Europljani (ukupno)	CEU <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	GBR <sup>b</sup>	IBS <sup>b</sup>	TSI <sup>b</sup>
<i>CYP3A4*22</i> (rs35599367)	*1/*1	<b>0.931</b> (1024)	0.903 (454)	0.909 (90)	0.909 (90)	0.8358 (76)	0.925 (99)	0.925 (99)
	*1/*22	<b>0.067</b> (74)	0.095 (48)	0.091 (9)	0.091 (9)	0.154 (14)	0.075 (8)	0.075 (8)
	*22/*22	<b>0.002</b> (2)	0.002 (1)	0	0	0.011 (1)	0	0

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup> Učestalosti alela prikupljene iz baze podataka 1000 Genoma

CEU – Stanovnici Utaha porijeklom iz sjeverne i zapadne Europe iz podataka CEPH; FIN –Finci u Finskoj; GBR –Britanci u Engleskoj; IBS – iberijska populacija; TSI – Toskanci u Italiji

**Tablica 12.** Prikaz učestalosti genotipova *CYP3A4\*22* u svijetu (preuzeto i prilagođeno prema [https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99366316-G-A?dataset=gnomad\\_r2\\_1](https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99366316-G-A?dataset=gnomad_r2_1))

NCBI dbSNP ID	Aleli	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	AFR <sup>b</sup>	EAS <sup>b</sup>	SAS <sup>b</sup>	AMR <sup>b</sup>	AJ <sup>b</sup>	Ostali <sup>b</sup>
<i>CYP3A4*22</i> (rs35599367)	*1	<b>0.9645</b>	0.9556	0.9643	0.9906	1	1	0.9752	0.9103	0.9706
	*22	<b>0.0355</b>	0.0444	0.0357	0.0094	0	0	0.0248	0.0897	0.0294

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup>Podaci preuzeti iz baze podataka The Genome Aggregation Database (gnomAD)

EUR – Europljani (osim Finaca); FIN – Finci; AFR – Afrikanci/Afroamerikanci; EAS – istočna Azija; SAS – Južna Azija; AMR – Latino i miješani Amerikanci; AJ – Aškenazi židovi

#### 4.3. Učestalost alela i genotipova polimorfizma *CYP3A5\*3*

Ispitivanje genotipa za polimorfizam *CYP3A5\*3* napravljeno je kod 440 ispitanika i pokazalo se da 83,18% ispitanika ima genotip \*3/\*3, 16,14% ima genotip \*1/\*3, a 0,68% ima genotip \*1/\*1.



**Tablica 13.** Prikaz učestalosti alela i genotipova polimorfizama *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji

<i>CYP3A5</i> *3	*3/*3	*1/*3	*1/*1	ukupno	broj alela	ukupni broj alela	učestalost alela	učestalost alela (%)
broj ispitanika	366	71	3	440				
	0,83182	0,16136	0,00682	1				
% ispitanika	83,18	16,14	0,68	100				
broj alela								
<i>CYP3A5</i> *3	732	71	0		803	880	0,9125	91,25
<i>CYP3A5</i> *1	0	71	6		77	880	0,0875	8,75
					880			100

Dalje su u tablicama prikazane učestalosti genotipova *CYP3A5\*3* u Europi i u svijetu.

**Tablica 14.** Prikaz učestalosti genotipova *CYP3A5\*3* u Europi (preuzeto i prilagođeno prema [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062))

Gen - alel	Genotip	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup> Europljani (ukupno)	CEU <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	GBR <sup>b</sup>	IBS <sup>b</sup>	TSI <sup>b</sup>
<i>CYP3A5</i> *3 (rs776746)	*1/*1	0.832 (366)	0.891 (448)	0.919 (91)	0.889 (88)	0.890 (81)	0.860 (92)	0.897 (96)
	*1/*3	0.161 (71)	0.105 (53)	0.081 (8)	0.101(10)	0.110 (10)	0.131 (14)	0.103 (11)
	*3/*3	0.007 (3)	0.004 (2)	-	0.010 (1)	-	0.009 (1)	-

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup> Učestalosti alela prikupljene iz baze podataka 1000 Genoma

CEU – Stanovnici Utaha porijeklom iz sjeverne i zapadne Europe iz podataka CEPH; FIN – Finci u Finskoj; GBR – Britanci u Engleskoj; IBS – iberijska populacija; TSI – Toskanci u Italiji

**Tablica 15.** Prikaz učestalosti genotipova *CYP3A5\*3* u svijetu (preuzeto i prilagođeno prema [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062))

NCBI dbSNP ID	Aleli	Hrvati <sup>a</sup>	EUR <sup>b</sup>	FIN <sup>b</sup>	AFR <sup>b</sup>	EAS <sup>b</sup>	SAS <sup>b</sup>	AMR <sup>b</sup>	AJ <sup>b</sup>	Ostali <sup>b</sup>
<i>CYP3A5</i> *3 (rs776746)	*1	0.0875	0.0710	0.0702	0.7020	0.2865	0.332	0.2085	0.1000	0.1700
	*3	0.9125	0.9290	0.9298	0.2980	0.7135	0.667	0.7915	0.9000	0.8300

<sup>a</sup> Promatrane učestalosti u ovom radu

<sup>b</sup> Podaci preuzeti iz baze podataka The Genome Aggregation Database (gnomAD)

EUR – Europljani (osim Finaca); FIN – Finci; AFR – Afrikanci/Afroamerikanci; EAS – istočna Azija; SAS – Južna Azija; AMR – Latino i miješani Amerikanci; AJ – Aškenazi židovi

## 5. RASPRAVA

Svi su ispitanici pripadnici bijele rase, državljani su Republike Hrvatske i dolaze ih svih dijelova Hrvatske. Skupljeni podaci su od uzoraka genotipiziranih u laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od 8 godina. Većinom je bila riječ o farmakogenetičkim analizama koje su napravljene za pacijente koji su imali nuspojave ili neučinkovitost lijekova koji su supstrati enzima CYP3A4 i CYP3A5. Određivane su klinički najvažnije su varijante *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*22*, ali i *CYP3A4\*1B* koji se uglavnom ne koristi se u kliničkoj praksi, iako je se smatra najviše istraživanim polimorfizmom gena *CYP3A4*. *CYP3A4\*1B* se ne koristi više u kliničkoj praksi zbog nerazriješene funkcionalne posljedice za aktivnost enzima i neravnotežne povezanosti (LD, od engl. *linkage disequilibrium*) s polimorfizmom *CYP3A5\*3*. Ovaj rad nije prvi u kojem se ispituje učestalost polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3*. Podaci o učestalosti polimorfizama CYP3A u hrvatskoj populaciji postoje. Takvo istraživanje je objavljeno 2017.gdoine, ali učestalosti nisu iz istog skupa podataka i LD za njih nije poznata. U ovom radu su istraživane učestalosti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u istom skupu podataka u hrvatskoj populaciji.

Rezultati su pokazali da učestalost polimorfizma *CYP3A4\*1B* u hrvatskoj populaciji iznosi 6,98%. Kod Europljana je učestalost tog polimorfizma 3.62% dok u svijetu iznosi 11.011%. Najveću učestalost imaju afrička i afroamerička populacija (63-75%).

Za *CYP3A4\*22* utvrđena je učestalost 3,55% u hrvatskoj populaciji dok podaci govore da je u Europi 4.619%, a u svijetu 4.194%. Kod istočnoazijskog stanovništva u potpunosti izostaje prisutnost alela \*22, kao i \*1B.

*CYP3A5\*3* prisutan je u Hrvatskoj kod 91,25% populacije, u Europi kod 7.003%, a u svijetu kod 11.264% populacije.

U radu Ganoci i sur. iz 2017. utvrđeno je da su učestalosti alela *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* iznose redom 1.4% 2.7% i 91.34%.

Bojanić i suradnici su u radu iz 2020. također su objavili učestalosti polimorfizama *CYP3A4\*1B* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji. Iako je riječ o drugoj ciljnoj populaciji, pacijenticama s karcinomom dojke, rezultati su prikazani u tablici 16.

**Tablica 56.** Usporedba rezultata ovog rada s prethodnima koji su ispitivali učestalost polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3*

	Ovaj rad, 2022.	Ganoci i sur., 2017.	Bojanić i sur., 2022.
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>			
*1/*1	86,43	97,26	94
*1/*1B	13,18	2,74	6
*1B*1B	0,39	0	0
<b><i>CYP3A4*22</i></b>			
*1/*1	93,09	94,67	-
*1/*22	6,73	5,33	-
*22*22	0,18	0	-
<b><i>CYP3A5*3</i></b>			
*1/*1	0,68	0,33	0
*1/*3	16,14	8,33	12
*3/*3	83,18	91,34	88

Možemo vidjeti da su rezultati ovog rada pokazali da je učestalost polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* nešto veća, nego što su to pokazali prethodni radovi. Taj pomak je očekivan zato što je vjerojatnije da su rutinski testirani za farmakogenetičke biljege bili pacijenti koji imaju problema s terapijom. Takva podloga i varijabilnost vjerojatno su povezani s genetičkom varijabilnošću i većom mogućnosti da se radi o nositeljima varijantnih gena. To se posebice odnosi na učestalost polimorfizma *CYP3A4\*1B* koji je najčešće određivan ako je pacijent nositelj varijantnog alela polimorfizma *CYP3A5\*3*.

## 6. ZAKLJUČAK

Farmakogenetiku neki smatraju budućnošću medicine, dok je ona već sada najbolji primjer personalizirane medicine u kliničkoj praksi. Postoje terapije za koje se lijekovi ni neće izdavati bez prethodne genotipizacije za enzime kojima se metaboliziraju. Posebno je to bitno kod pametnih lijekova, koji su izrazito skupi, ali ne postoji razlog zašto se genotipizacija ne bi provodila i za češće i jeftinije lijekove poput imunosupresiva. Transplantacije organa dostignuća su medicine kojim pacijent dobiva novu šansu za život, često nakon dugotrajnih, mukotrnih bolesti. Nuspojave lijekova u tim stanjima ili riskiranje odbacivanja organa zbog nedovoljno dobro titrirane doze lijeka nikako nisu poželjne, a genotipizacijom pacijenta lako ih je izbjeći. Za takrolimus, kao jedan od najčešćih imunosupresiva, postoje smjernice za genotipizaciju enzima CYP3A5 kojim se metabolizira, no za CYP3A4, kojim se općenito metabolizira najviše lijekova, i za koji postoje sumnje da utječe na metabolizam takrolimusa, ne postoje još nikakve smjernice.

Genotipizacija CYP3A5 posebno je važna budući da je u hrvatskoj populaciji prevalencija alela *CYP3A5\*3* vrlo velika (91,25% prema ovom radu), a taj polimorfizam u nomenklaturi nije „normalan“, ekstenzivni metabolizator, kao *CYP3A5\*1*, nego je heterozigot nositelj alela *CYP3A5\*3* srednji metabolizator, a homozigot s oba *CYP3A5\*3* alela je spor metabolizator.

U KBC-u Zagreb uvedena su i testiranja na *CYP3A4\*1B* i *CYP3A4\*22* za koje postoji sumnja da utječu na metabolizam takrolimusa. Za njih možda ne postoje kliničke smjernice, no dokazi iz prakse upućuju na njihov utjecaj na brzinu metabolizma takrolimusa što genotipizaciju te prikupljanje i obradu podataka o njihovoj učestalosti čini itekako vrijednima.

## 7. LITERATURA

Alfirevic A, Pirmohamed M. Drug-induced hypersensitivity reactions and pharmacogenomics: past, present and future. *Pharmacogenomics*. 2010;497-9.

Aoyama, T. et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine. *J Biol Chem* 1989, 264, 10388-10395

Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, Wang D, Vinks AA, He Y, Swen JJ, Leeder JS, van Schaik R, Thummel KE, Klein TE, Caudle KE, MacPhee IA. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther.*, 2015, 98, 19-24

Bojanic K, Kuna L, Bilic Curcic I i sur, Representation of CYP3A4, CYP3A5 and UGT1A4 Polymorphisms within Croatian Breast Cancer Patients' Population, *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17, 3692.

Bolbrinker, J., Seeberg, S., Schostak, M., Kempkensteffen, C., Baelde, H., De Heer, E., et al. CYP3A5 genotype–phenotype analysis in the human kidney reveals a strong site-specific expression of CYP3A5 in the proximal tubule in carriers of the CYP3A5\*1 allele. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40, 639-641.

Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 1-34.

Bu, HZ. A literature review of enzyme kinetic parameters for CYP3A4- mediated metabolic reactions of 113 drugs in human liver microsomes: structure–kinetics relationship assessment. *Curr Drug Metab*, 2006, 7, 231-249.

Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, i sur. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: Consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med*, 2017, 19, 215–223.

Chandel, N., Aggarwal, P.K., Minz, M., Sakhuja, V., Kohli, K.K. & Jha, V. CYP3A5\*1/\*3 genotype influences the blood concentration of tacrolimus in response to metabolic inhibition by ketoconazole. *Pharmacogenet. Genomics*, 2009, 19, 458-463.

Collins JM, Wang D. Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 by a lncRNA: a potential underlying mechanism explaining the association between CYP3A4\*1G and CYP3A metabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2022, 32, 16-23.

Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet*. 2006, 45, 13-31.

Davydov DR, Davydova NY, Sineva EV, Halpert JR. Interactions among cytochromes P450 in microsomal membranes: oligomerization of cytochromes P450 3A4, 3A5, and 2E1 and its functional consequences. *J Biol Chem*. 2015, 290, 3850-64.

De Wildt SN, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Brojeni PY, van der Heiden IP, Parshuram C, Nulman I, Koren G. The interactions of age, genetics, and disease severity on tacrolimus dosing requirements after pediatric kidney and liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011, 1231-41

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003, 43, 149-73

Dunvald AD, Järvinen E, Mortensen C, Stage TB. Clinical and Molecular Perspectives on Inflammation-Mediated Regulation of Drug Metabolism and Transport. *Clin Pharmacol Ther*. 2021

Dutheil F, Beaune P, Lorient MA. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*. 2008, 90, 426-36.

Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics*. 2013, 14, 47-62.

Ferraris JR, Argibay PF, Costa L, Jimenez G, Coccia PA, Ghezzi LF, Ferraris V, Belloso WH, Redal MA, Larriba JM. Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus maintenance

doses and serum levels after renal transplantation: age dependency and pharmacological interaction with steroids. *Pediatr Transplant*. 2011, 15, 525-32.

Fuhr U, Jetter A, Kirchheiner J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach. *Clin Pharmacol Ther*. 2007, 81, 270-83.

Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Uemoto S, Inui K. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008, 18, 413-23.

Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther*. 2017, 32, 11-21.

García-Roca P, Medeiros M, Reyes H, Rodríguez-Espino BA, Alberú J, Ortiz L, Vásquez-Perdomo M, Elizondo G, Morales-Buenrostro LE, Mancilla Urrea E, Castañeda-Hernández G. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res*. 2012, 43, 283-7.

Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2008, 21, 70-83.

Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Saarikoski S, Vähäkangas K, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Pasanen M. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate*. 2001, 80, 193-201.

Hendrychová T, Anzenbacherová E, Hudeček J, Skopalík J, Lange R, Hildebrandt P, Otyepka M, Anzenbacher P. Flexibility of human cytochrome P450 enzymes: molecular dynamics and spectroscopy reveal important function-related variations. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1814, 58-68.

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99783973-99784973;v=rs2740574;vdb=variation;vf=730033313](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99783973-99784973;v=rs2740574;vdb=variation;vf=730033313), pristupljeno 24.6.2022.

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99768193-99769193;v=rs35599367;vdb=variation;vf=733872089](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99768193-99769193;v=rs35599367;vdb=variation;vf=733872089) , pristupljeno 24.6.2022.

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:99672416-99673416;v=rs776746;vdb=variation;vf=729113062) , pristupljeno 24.6.2022.

<https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c8c7ba9d4f2ef3300632942/t-5cf004269cf1ff003377d8cd-polymerase-chain-reaction-pcr>, pristupljeno 20.6.2022.

<https://drug-interactions.medicine.iu.edu/MainTable.aspx> , pristupljeno 22.6.2022.

[https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99366316-G-A?dataset=gnomad\\_r2\\_1](https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99366316-G-A?dataset=gnomad_r2_1) , pristupljeno 24.6.2022.

[https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99382096-C-T?dataset=gnomad\\_r2\\_1](https://gnomad.broadinstitute.org/variant/7-99382096-C-T?dataset=gnomad_r2_1) , pristupljeno 24.6.2022.

<https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>

<https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/> , pristupljeno 20.6.2022.

<https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications> , pristupljeno 20.6.2022.

<https://www.hdm.hr/podaci-za-hrvatsku/> , pristupljeno 23.6.2022.

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2740574?vertical\\_tab=true#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2740574?vertical_tab=true#frequency_tab) , pristupljeno 25.6.2022.

<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction> , pristupljeno 20.6.2022. Hu DG, Marri S, McKinnon RA, Mackenzie PI, Meech R. Deregulation of the Genes that Are Involved in Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion in Hepatocellular Carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019, 368, 363, 381.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmüller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2001, 11, 773-9.



Ingelman-Sundberg M, Cascorbi I. Pharmacogenomic or -epigenomic biomarkers in drug treatment: Two sides of the same medal? *Clin Pharmacol Ther.* 2016, 99 ,478-80.

Jeffrey C. Stevens, Ronald N. Hines, Chungang Gu, Sevasti B. Koukouritaki, Jason R. Manro, Peter J. Tandler and Matthew J. Zaya. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 307, 573-582

Ji E, Choi L, Suh KS, Cho JY, Han N, Oh JM. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation. *Transplantation.* 2012, 94, 866-72.

Kasichayanula S, Boulton DW, Luo WL, Rodrigues AD, Yang Z, Goodenough A, Lee M, Jemal M, LaCreta F. Validation of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol and evaluation of other endogenous biomarkers for the assessment of CYP3A activity in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2014, 78, 1122-34.

Kausman JY, Patel B, Marks SD. Standard dosing of tacrolimus leads to overexposure in pediatric renal transplantation recipients. *Pediatr Transplant.* 2008, 12, 329-35.

Klomp SD, Manson ML, Guchelaar HJ, Swen JJ. Phenoconversion of Cytochrome P450 Metabolism: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2020, 9, 2890.

Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmüller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos.* 2002, 30, 1108-14.

Kuban W, Daniel WA. Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metab Rev.* 2021, 53 ,1-29.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001, 27, 383-91.

Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Vanrenterghem Y. Effects of CYP3A5 and MDR1 single nucleotide polymorphisms on drug interactions between tacrolimus and fluconazole in renal allograft recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008, 18, 861-8.

- L., Suh, K.S., Cho, J.Y., Han, N. & Oh, J.M. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation, 2012
- Lalan S, Abdel-Rahman S, Gaedigk A, Leeder JS, Warady BA, Dai H, Blowey D. Effect of CYP3A5 genotype, steroids, and azoles on tacrolimus in a pediatric renal transplant population. *Pediatr Nephrol.* 2014, 29, 2039-49.
- Li D, Zhu JY, Gao J, Wang X, Lou YQ, Zhang GL. Polymorphisms of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, cytochrome P450 3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus. *Clin Chim Acta.* 2007, 383, 133-9.
- Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, Schuetz EG, Thummel KE. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol.* 2002, 62, 162-72.
- Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 2007, 39, 699-721.
- Moore J, McKnight AJ, Döhler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, Briggs D, Ball S, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Opelz G, Borrows R. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol.* 2012, 23, 1891-9.
- Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, Iwamoto T, Uemoto S, Nobori T, Okuda M. Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant.* 2011, 16, 55-62.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003, 349, 2326-33.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004, 14, 1-18.

Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T. Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos.* 2012, 40, 83-92.

Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* 2008, 9, 129-43.

PharmVar, The Pharmacogene Variation Consortium. CYP3A4 gene, 2022.  
<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A4>, pristupljeno 20. 5. 2022.

PharmVar, The Pharmacogene Variation Consortium. CYP3A5 gene, 2022.  
<https://www.pharmvar.org/gene/CYP3A5>, pristupljeno 20. 5. 2022.

QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, QIAGEN, 2016, str. 12.

Raunio H, Hakkola J, Pelkonen O. Regulation of CYP3A genes in the human respiratory tract. *Chem Biol Interact.* 2005, 151, 53-62.

Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90, 1225-9.

Roden DM, McLeod HL, Relling MV, Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, Van Driest SL. Pharmacogenomics. *Lancet*, 2019, 394, 521-532.

Rodriguez-Antona C, Savieo JL, Lauschke VM, Sangkuhl K, Drögemöller BI, Wang D, van Schaik RHN, Gilep AA, Peter AP, Boone EC, Ramey BE, Klein TE, Whirl-Carrillo M, Pratt VM, Gaedigk A. PharmVar GeneFocus: CYP3A5. *Clin Pharmacol Ther.* 2022

Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 274, 355-65.

Scott EE, Halpert JR. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem Sci.* 2005, 30, 5-7.

- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994, 270, 414-23. .
- Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med.* 2001, 7, 201-4.
- Šimičević L, Canjuga I, Zibar L, Borić-Bilušić A, Ganoci L, Božina N. Rapid clearance of tacrolimus blood concentration triggered by variant pharmacogenes. *J Clin Pharm Ther.* 2022, 27.
- Thangavel C, Boopathi E, Shapiro BH. Inherent sex-dependent regulation of human hepatic CYP3A5. *Br J Pharmacol.* 2013, 168, 988-1000.
- Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, Toupance O, Touchard G, Alberti C, Le Pogamp P, Moulin B, Le Meur Y, Heng AE, Subra JF, Beaune P, Legendre C. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010, 87, 721-6.
- Tohkin M, Ishiguro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, Hasegawa R. Prediction of severe adverse drug reactions using pharmacogenetic biomarkers. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2010, 25, 122-133.
- Van Gelder, T. Drug interactions with tacrolimus, *Drug Saf*, 2002, 25, 707-712.
- Van Schaik, R.H., van der Heiden, I.P., van den Anker, J.N. & Lindemans, J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch caucasians, *Clin Chem*, 2002, 48, 1668-1671.
- Von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivistö KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther.* 2004, 75, 172-83.
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J*, 2011, 11, 274-286.

- Wang D, Sadee W. CYP3A4 intronic SNP rs35599367 (CYP3A4\*22) alters RNA splicing. *Pharmacogenet Genomics*. 2016, 26, 40-3.
- Wang YM, Chai SC, Brewer CT, Chen T. Pregnane X receptor and drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metabol Toxicol*, 2014, 10, 1521-1532.
- Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, Sheng Y. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transp*, 2006, 12, 775-780.
- Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96, 340-348.
- Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31, 755-761.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 883-891.
- Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver, *Hepatology*, 2003, 38, 978-888.
- Wright WC, Cheng J, Chen T. Structural Perspectives of the CYP3A Family and Their Small Molecule Modulators in Drug Metabolism, *Liver Res*, 2019, 3, 132-142.
- Yablokov, E.O. et al. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners, *Biochimie*, 2019, 162, 156-166.
- Yamaori S, Yamazaki H, Suzuki A, Yamada A, Tani H, Kamidate T, Fujita Ki, Kamataki T. Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7, *Biochem Pharmacol*, 2003, 66, 2333-2340.

Yip VL, Alfirevic A, Pirmohamed M. Genetics of immune-mediated adverse drug reactions: a comprehensive and clinical review, *Clin Rev Allergy Immunol*, 2015, 48, 165-75.

Yu S, Wu L, Jin J, Yan S, Jiang G, Xie H, Zheng S. Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation, *Transplantation*, 2006, 81, 46-51.

Yvonne S. Lin, Amy L. S. Dowling, Sean D. Quigley, Federico M. Farin, Jiong Zhang, Jatinder Lamba, Erin G. Schuetz and Kenneth E. Thummel. *Molecular Pharmacology*, 2002, 62, 162-172

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

Zhai, Qinglian & van der Lee, Maaïke & Gelder, Teun & Swen, Jesse. (2022). Why We Need to Take a Closer Look at Genetic Contributions to CYP3A Activity. *Frontiers in Pharmacology*. 2022,13, 912618.

Zhao, W. et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients, *Clin Pharmacol Ther*, 2009, 86, 609-618.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Enzimi pod-porodice citokroma P450 3A (CYP3A) sudjeluju u metabolizmu oko 50% lijekova u kliničkoj primjeni. Najvažniji su enzimi CYP3A4 i CYP3A5, za koje je karakteristična interindividualna varijabilnost i često preklapanje supstrata. Genetičke varijante mogu objasniti dio varijabilnosti aktivnosti CYP3A. Klinički najvažnije su varijante *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*22*. Polimorfizam *CYP3A4\*1B* ne koristi se u kliničkoj praksi zbog nerazriješene funkcionalne posljedice za aktivnost enzima i neravnotežne povezanosti (LD, od engl. *linkage disequilibrium*) s polimorfizmom *CYP3A5\*3*. Podaci o učestalosti polimorfizama CYP3A u hrvatskoj populaciji postoje, ali nisu iz istog skupa podataka i LD za njih nije poznata. U ovom radu su istraživane učestalosti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u istom skupu podataka u hrvatskoj populaciji.

Uzorci DNA izolirani su iz uzoraka pune krvi tijekom 8 godina rutinskih farmakogenetičkih analiza u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U ovo istraživanje uključen je ukupno 1100 ispitanik. Genotipizacija *CYP3A4\*1B* (rs2740574), *CYP3A4\*22* (rs35599367) i *CYP3A5\*3* (rs776746) je provedena PCR metodom u stvarnom vremenu TaqMan® pomoću reagenasa TaqMan® Genotyping Assays.

Učestalosti varijantnih alela bile su za *CYP3A4\*1B*=0.0698 (n=258), *CYP3A4\*22*=0.0355 (n=1100) i *CYP3A5\*3*=0.9645 (n=440). Analiza genotipova polimorfizma *CYP3A4\*1B* pokazala je da 86,43% ispitanika ima genotip *\*1/\*1*, 13,18% ima genotip *\*1/\*1B*, a 0,39% ima genotip *\*1B/\*1B*. Analiza genotipova polimorfizma *CYP3A4\*22* pokazala je da 93,09% ispitanika ima genotip *\*1/\*1*, 6,73% ima genotip *\*1/\*22*, a 0,18% ima genotip *\*22/\*22*. Analiza genotipova polimorfizma *CYP3A5\*3* pokazala je da 83,18% ispitanika ima genotip *\*3/\*3*, 16,14% ima genotip *\*1/\*3*, a 0,68% ima genotip *\*1/\*1*.

U ovom radu učestalosti svih ispitivanih polimorfizama su bile nešto veće od prethodnih studija provedenih u hrvatskoj populaciji, jer se radi o pacijentima koji su genotipizirani u kliničkom okružju zbog nuspojava i/ili neučinkovitosti pri primjeni lijekova koji su supstrati enzimskog sustava CYP3A. To se posebice odnosi na polimorfizam *CYP3A4\*1B* koji je određivan uglavnom u nositelja *CYP3A5\*1*.

Učestalost alela i genotipova varijanti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji u skladu je s ostalim europskim populacijama. Potrebno je dodatno istražiti funkcionalnu posljedicu *CYP3A4\*1B* i potencijalnu povezanost s pojačanom aktivnosti CYP3A neovisno o učinku *CYP3A5\*3* budući da ovi polimorfizmi nisu u potpunoj neravnotežnoj povezanosti.

Cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily enzymes are involved in the metabolism of about 50% of drugs in clinical use. The most important are CYP3A4 and CYP3A5 enzymes, which are characterised by interindividual variability and often have overlapping substrates. Genetic variants may explain part of the variability in CYP3A activity. The clinically most important are variants *CYP3A5\*3* and *CYP3A4\*22*. The *CYP3A4\*1B* polymorphism is not used in clinical practice due to the unresolved functional consequences for enzyme activity and linkage disequilibrium (LD) with *CYP3A5\*3* polymorphism. Data on the frequency of CYP3A polymorphisms in the Croatian population exist, but they are not from the same dataset, and their LD is unknown. In this study, the frequencies of *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* were investigated in the same data set in the Croatian population.

DNA samples were extracted from whole blood samples over eight years of routine pharmacogenetic testing at the University Hospital Centre Zagreb. A total of 1100 subjects were included in this study. Genotyping was performed by TaqMan® real-time PCR method using TaqMan Genotyping Assays for *CYP3A4\*1B* (rs2740574), *CYP3A4\*22* (rs35599367) and *CYP3A5\*3* (rs776746).

CYP3A allele frequencies were *CYP3A4\*1B*=0.0698 (n=258), *CYP3A4\*22*=0.0355 (n=1100) and *CYP3A5\*3*=0.9645 (n=440). Analysis of genotypes of the *CYP3A4\*1B* polymorphism showed that 86.43% of subjects had the genotype *\*1/\*1*, 13.18% had the genotype *\*1/\*1B*, and 0.39% had the genotype *\*1B/\*1B*. Analysis of genotypes of the *CYP3A4\*22* polymorphism showed that 93.09% of subjects had the genotype *\*1/\*1*, 6.73% had the genotype *\*1/\*22*, and 0.18% had the genotype *\*22/\*22*. Analysis of genotypes of the *CYP3A5\*3* polymorphism showed that 83.18% of subjects had the genotype *\*3/\*3*, 16.14% had the genotype *\*1/\*3*, and 0.68% had the genotype *\*1/\*1*.

In this study, the frequencies of all investigated polymorphisms were slightly higher than in previous studies conducted in the Croatian population, because the study sample was made up of patients tested for pharmacogenetic markers due to side effects and/or ineffectiveness when using drugs that are substrates of the CYP3A enzyme system. This particularly applies to the *CYP3A4\*1B* polymorphism, which was determined mainly in *CYP3A5\*1* carriers.

The frequency of the *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* variant alleles and genotypes in the Croatian population is in accordance with the other European populations. The functional significance of *CYP3A4\*1B* polymorphism and the potential association with enhanced CYP3A activity, independent of the effect of *CYP3A5\*3*, needs to be further investigated since these polymorphisms are not in a complete LD.



## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Samostalni kolegij: Specijalna područja kliničke biokemije  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Učestalost polimorfizama *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji

Sandra Petreković

#### SAŽETAK

Enzimi pod-porodice citokroma P450 3A (*CYP3A*) sudjeluju u metabolizmu oko 50% lijekova u kliničkoj primjeni. Najvažniji su enzimi *CYP3A4* i *CYP3A5*, za koje je karakteristična interindividualna varijabilnost. Genetičke varijante mogu objasniti dio varijabilnosti aktivnosti *CYP3A*. Klinički najvažnije su varijante *CYP3A5\*3* i *CYP3A4\*22*, manje važan je polimorfizam *CYP3A4\*1B*. Podaci o učestalosti polimorfizama *CYP3A* u hrvatskoj populaciji postoje, ali nisu iz istog skupa podataka. U ovom radu su istraživane učestalosti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u istom skupu podataka u hrvatskoj populaciji.

Uzorci DNA izolirani su iz uzoraka pune krvi tijekom 8 godina rutinskih farmakogenetičkih analiza u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U ovo istraživanje uključen je ukupno 1100 ispitanik. Genotipizacija *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* je provedena PCR metodom u stvarnom vremenu TaqMan®.

Učestalosti varijantnih alela bile su za *CYP3A4\*1B*=0.0698 (n=258), *CYP3A4\*22*=0.0355 (n=1100) i *CYP3A5\*3*=0.9645 (n=440). Analiza genotipova polimorfizama pokazala je: (i) za *CYP3A4\*1B* 86,43% ispitanika su nositelji genotipa *\*1/\*1*, 13,18% genotipa *\*1/\*1B*, a 0,39% genotipa *\*1B/\*1B*; (ii) za *CYP3A4\*22* 93,09% su nositelji genotipa *\*1/\*1*, 6,73% genotipa *\*1/\*22*, a 0,18% genotipa *\*22/\*22*; (iii) za *CYP3A5\*3* 83,18% ispitanika su nositelji genotipa *\*3/\*3*, 16,14% genotipa *\*1/\*3*, a 0,68%, a genotipa *\*1/\*1*. U ovom radu su učestalosti svih ispitivanih polimorfizama su bile nešto veće od prethodnih studija provedenih u hrvatskoj populaciji, jer se radi o pacijentima koji su genotipizirani u kliničkom okruženju zbog nuspojava i/ili neučinkovitosti lijekova supstrata *CYP3A*. Učestalost alela i genotipova varijanti *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* i *CYP3A5\*3* u hrvatskoj populaciji u skladu je s ostalim europskim populacijama.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranice, 14 grafičkih prikaza, 16 tablica i 84 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: farmakogenetika, polimorfizam, citokrom P450, *CYP3A4*, *CYP3A5*

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Lana Ganoci**, docent, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Lana Ganoci**, docent, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb  
**Dr. sc. Roberta Petlevski**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Independent course: Special areas of clinical biochemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Frequency of *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* polymorphisms in the Croatian population

Sandra Petreković

#### SUMMARY

Cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily enzymes are involved in the metabolism of about 50% of drugs in clinical use. The most important are CYP3A4 and CYP3A5 enzymes, which are characterised by interindividual variability. Genetic variants can explain part of the variability of CYP3A activity. The clinically most important are variants *CYP3A5\*3* and *CYP3A4\*22*, while the *CYP3A4\*1B* is less important. Data on the frequency of CYP3A polymorphisms in the Croatian population exist, but they are not from the same dataset. In this study, the frequencies of *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* were investigated in the same data set in the Croatian population.

DNA samples were extracted from whole blood samples over eight years of routine pharmacogenetic testing at the University Hospital Centre Zagreb. A total of 1100 subjects were included in this study. Genotyping of *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* was performed by the TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR method.

CYP3A allele frequencies were *CYP3A4\*1B*=0.0698 (n=258), *CYP3A4\*22*=0.0355 (n=1100) and *CYP3A5\*3*=0.9645 (n=440). The analysis of genotypes showed: (i) for *CYP3A4\*1B*, 86.43% of subjects were carriers of genotype *\*1/\*1*, 13.18% of genotype *\*1/\*1B*, and 0.39% of genotype *\*1B/\*1B*; (ii) for *CYP3A4\*22*, 93.09% are carriers of the *\*1/\*1* genotype, 6.73% of the *\*1/\*22* genotype, and 0.18% of the *\*22/\*22* genotype; (iii) for *CYP3A5\*3*, 83.18% of respondents are carriers of the *\*3/\*3* genotype, 16.14% of the *\*1/\*3* genotype, and 0.68% of the *\*1/\*1* genotype.

In this study, the frequencies of all investigated polymorphisms were slightly higher than in previous studies conducted on the Croatian population. The frequency of the *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*22* and *CYP3A5\*3* variant alleles and genotypes in the Croatian population is in accordance with the other European populations.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 14 figures, 16 tables and 84 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pharmacogenetics, polymorphism, cytochrome P450, CYP3A4, CYP3A5

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lana Ganoci, Ph.D.**, Assistant Professor, analit. toxicol. spec., University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lana Ganoci, Ph.D.**, Assistant Professor, analit. toxicol. spec., University Hospital Centre Zagreb  
**Robert Petlevski, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.