

Betydning av *CYP3A4/5*- og *POR*- genotype for individuell variasjon i nivå av 4 β -hydroksykolesterol

Kristine Heitmann



Masteroppgave i farmakologi ved
Farmasøytisk Institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Betydning av *CYP3A4/5*- og *POR*- genotype for individuell variasjon i nivå av 4 β -hydroksykolesterol

Masteroppgave i farmakologi for graden Master i farmasi ved
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

Universitetet i Oslo

Oppgaven ble utført ved Senter for Psykofarmakologi

Diakonhjemmet sykehus, Oslo

Veiledere:

Professor II Espen Molden

Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Caroline Gjestad

Senter for Psykofarmakologi

Diakonhjemmet sykehus

Stipendiat Kristine Hole

Senter for Psykofarmakologi

Diakonhjemmet sykehus

Kristine Heitmann

Mai 2015

©Kristine Heitmann

2015

Betydning av *CYP3A4/5*- og *POR*-genotype for individuell variasjon i nivå av 4 β -
hydroksykolesterol

Kristine Heitmann

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil først rette en stor takk til min hovedveileder, Espen Molden, for faglige innspill, inspirasjon, veiledning og for enestående hjelp under hele skriveprosessen.

To andre som fortjener en stor takk er mine to veiledere Kristine Hole og Caroline Gjestad for fantastisk hjelp på laboratoriet, opplæring, korrekturlesing og ellers gjennom hele skriveprosessen.

Jeg vil også takke Birgit Wollmann som har delt kontor med meg dette året. Takk for at du gjorde året mitt enda bedre ved hjelp av fantastisk samarbeid, mye latter, faglige diskusjoner, og alle de gode samtalene våre. Ane Wenstad Haug fortjener også en stor takk her.

Tusen takk til alle på Senter for Psykofarmakologi for et kjempeflott år. Jeg har hatt et lærerikt og utrolig hyggelig år hos dere. Jeg vil også gi en takk til Sara Bremer for utførelsen av genotypingen.

Til slutt vil jeg takke venner og familie for støtte og interesse gjennom året. En spesiell takk til Thomas for korrekturlesing. En stor takk til alle venner på farmasi som har gjort dette året og resten av studietiden så fantastisk.

Forkortelser

CYP- cytokrom P450

EM- Raske omsettere (extensive metabolizers eng.)

HEM- Heterozygot intermediære omsettere(heterozygot extensive metabolizers eng)

KI- Konfidensintervall

LC-MS/MS- væskekromatografi med tandem massespektrometrisk deteksjon

LLOQ -nedre kvantifiseringsgrense (lower limit of quantification eng.)

PCR- real-time polymerase chain reaction

PM-langsomme omsettere (poor metabolizers eng.)

POR- P450 oksidoreduktase

PPAR α - Peroxisom proliferator-aktivert reseptor alfa

SNP- Single Nucleotide Polymorphism

SFP- Senter for Psykofarmakologi

TDM- Terapeutisk legemiddelmonitorering (therapeutic drug monitoring)

UM- Ultrarask omsettere (ultrarapid metabolizers eng.)

UPLC- «ultra performance liquid chromatography»

4 β -OH-K 4 β -hydroksykolesterol

6 β -OH-F- 6 β -hydroksykortisol

Sammendrag

Problemstilling: Enzymer tilhørende cytokrom P450 3A (CYP3A)-subfamilien representerer de viktigste i metabolisme av legemidler. Det er stor individuell variasjon i CYP3A-fenotype, og 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) er en aktuell biomarkør for denne variasjonen. Hensikten med dette masterprosjektet var å undersøke betydningen av *CYP3A4/5*- og *P450 oksidoreduktase (POR)*-genotype for individuell variasjon i CYP3A-fenotype, målt som nivå av 4 β -OH-K.

Metode: Prosjektet tok utgangspunkt i biobankede serum- og blodprøver fra 400 pasienter, ved Senter for Psykofarmakologi (SFP), Diakonhjemmet Sykehus. Serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K ble analysert med en tidligere etablert UPLC-APCI-MS/MS-metode ved SFP, mens aktuelle mutasjoner i kandidatgenene, henholdsvis *CYP3A4**22 (15389C>T), *CYP3A5**3 (6986A>G) og *POR**28 (1508C>T), ble analysert ved Avdeling for Biomedisinsk Biokjemi, Rikshospitalet. Rekvisisjoner tilknyttet de inkluderte serumprøvene ble gjennomgått, og informasjon om evt. komedikasjon med CYP3A-indusere eller -hemmere registrert. Serum fra pasienter med 4 β -OH-K konsentrasjoner over 250 nmol/L ble i tillegg systematisk analysert for evt. tilstedeværelse av enzyminduserende antiepileptika (fenobarbital, fenytoin og karbamazepin). Personer med kjent bruk av CYP3A-indusere eller -hemmere ble ekskludert fra statistiske analyser. Studiegruppen ble videre delt i ulike *CYP3A*-genotypekombinasjonene for å undersøke betydning av *POR*-genotype i de ulike genotypekombinasjonene for nivået av 4 β -OH-K. Statistiske sammenligninger av 4 β -OH-K-nivåer mellom subgrupper i studien ble gjort ved ikke-parametriske av Mann-Whitney tester.

Resultater: Serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K varierte fra 13.1 til 1370 nmol/L, og i alt fem pasienter ble bekreftet komedisinert med CYP3A-induseren karbamazepin. Disse hadde alle høye serumkonsentrasjoner av 4 β -OH-K (245-1370 nmol/L). For bærere av *CYP3A4**1/*22 ble det målt en om lag 20 % lavere median 4 β -OH-K serumkonsentrasjon sammenlignet med *CYP3A4**1/*1-bærere, hhv. 43.6 og 57.8 nmol/L (p=0.0145). Tilsvarende var mediankonsentrasjon av 4 β -OH-K signifikant høyere hos bærere av funksjonell vs. Ikke-funksjonell *CYP3A5*-genotype, hhv. 62.8 vs. 52.2 nmol/L (p=0,004). *POR**28/*28 hadde størst betydning for genotypekombinasjonen *CYP3A4**1/*1 + *CYP3A5**1-bærere, hvor median serumkonsentrasjon var 102.7 nmol/L.

Konklusjon: Denne studien viser at *CYP3A4/5*- og *POR*-genotyper har signifikant betydning for individuell variasjon i CYP3A-fenotype. Personer med ikke-funksjonell *CYP3A5*-

genotype i kombinasjon med *CYP3A4**22 kan tenkes å representere en gruppe med generelt nedsatt CYP3A-fenotype, men effekten på farmakokinetisk variasjon kan variere mellom ulike CYP3A-substrater. Videre tyder studien på at effekten av genvarianten *POR**28 varierer mye avhengig av den enkelte persons *CYP3A4/5*-genotype, og mister trolig påvirkningsevne ved nedsatt CYP3A4-metabolisme.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Variasjon i legemiddelrespons	1
1.2	Metabolisme av legemidler	2
1.3	Genetisk polymorfisme	3
1.4	Betydning av miljøfaktorer for enzymaktivitet	4
1.5	Cytokrom P450-systemet	4
1.6	CYP2D6 og CYP2C19	5
1.7	CYP3A	6
1.8	Regulering av CYP3A-aktivitet	7
1.9	Biomarkører for CYP3A-fenotype	9
1.10	4 β -hydroksykolesterol	10
1.11	Hensikt	12
2	Metode	13
2.1	Materiale	13
2.2	Serumkonsentrasjonsmålinger av 4 β -OH-K	15
2.2.1	Prøveopparbeidelse	15
2.2.2	UPLC-APCI-MS/MS-analyse	16
2.3	Genotyping	17
2.4	Endepunkter og statistiske analyser	17
2.5	Etikk og godkjenninger	19
3	Resultater	21
3.1	Materialbeskrivelse	21
3.2	Deskriptive data og fenotypefordeling	22
3.3	Betydning av genotypen til CYP2D6 og CYP2C19 for 4 β -OH-K- konsentrasjon	24
3.4	Betydning av CYP3A5-genotype for 4 β -OH-K- konsentrasjon	24
3.5	Betydning av CYP3A4-genotype for 4 β -OH-K- konsentrasjon	25
3.6	Betydning av genotypekombinasjoner for 4 β -OH-K- konsentrasjon	25
3.7	Betydning av alder	27
4	Diskusjon	28
5	Konklusjon	34
	Litteraturliste	35

1 Introduksjon

1.1 Variasjon i legemiddelrespons

Alvorlige bivirkninger av legemidler skyldes omlag 5 % av alle sykehusinnleggelser, og andelen ser ut til å være enda høyere for eldre (1). Bare i USA dør omtrent 100 000 mennesker årlig av alvorlige legemiddelreaksjoner (2). En rekke faktorer kan være utslagsgivende for at et individ utvikler bivirkninger. Det er blant annet observert store individuelle variasjoner i omsetning, og hvordan ulike individer responderer på et legemiddel. Serumkonsentrasjonen kan etter inntak av en gitt dose legemiddel variere med en faktor på 10-20 og en faktor på 1000 i ekstreme tilfeller (3). Et antatt legemiddel gitt i en dose som hos enkelte gir terapivikt, kan hos andre medføre uønskede effekter. For mange legemidler er det beskrevet et terapeutisk serumkonsentrasjonsområde som indikerer hvor det med høyst sannsynlighet vil oppstå gunstige effekter, i tillegg til begrenset bivirkningsrisiko (4). Legemidler med bredt serumkonsentrasjonsområde («vindu») er mindre sårbare for individuell farmakokinetisk variasjon enn legemidler med smalt terapeutisk vindu (4).

Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) er et verktøy for å sikre størst mulig sannsynlighet for ønsket legemiddelrespons, og kan bidra til tilpasset dosering til den enkelte pasient (5). Ved TDM måles legemiddelkonsentrasjonen, vanligvis i serum eller plasma, ved «steady-state»-betingelser. Mange laboratorier tilbyr måling av modersubstansen og metabolitter, da dette kan gi mer utfyllende informasjon til behandlende lege (5, 6). Det er en forutsetning at målingen er tatt til riktig tid da serumkonsentrasjonen varierer gjennom døgnet (5). TDM kan da brukes til evaluering ved endringer, eksempelvis dosering, interaksjoner, etterlevelse, sykdom, endret legemiddelformulering, bivirkninger og ved terapivikt (6-8).

En rekke faktorer kan påvirke legemidlets farmakologiske egenskaper, og dermed hvordan et individ responderer på legemidlet. Faktorer som spiller inn på den observerte variasjonen er: genetik, alder, kjønn, kroppsvekt, komorbiditet, etterlevelse, interaksjoner med andre legemidler eller naturmidler, miljø og livsstilsfaktorer (4). Når det gjelder variasjon i farmakokinetikk, er individuelle forskjeller i legemiddelmetabolisme en viktig faktor.

Farmakodynamikk er hvordan legemidlet påvirker kroppen, og farmakokinetikk kan sees på som hvordan kroppen håndterer legemidlet. Den farmakokinetiske variasjonen kan beskrives

gjennom konsentrasjonsmålinger av legemidlet og doseringen kan tilpasses de faktiske farmakokinetiske forholdene. Farmakodynamiske forhold beskrives ikke direkte gjennom konsentrasjonsmålinger, da variabilitet her ligger på reseptornivå (9). Farmakokinetiske prosesser omfatter absorpsjon, distribusjon, metabolisme og ekskresjon. Endringer i overnevnte prosesser vil kunne gi variasjon i serumkonsentrasjonen til legemidler (9). Tvillingstudier har avdekket at farmakokinetiske egenskaper som legemiddelmetabolisme ser ut til å være arvelig (10).

1.2 Metabolisme av legemidler

Variabilitet i metabolisme av legemidler er en faktor som kan gi forskjell i serumkonsentrasjonen til legemidler. Legemidler er ofte lipofile substanser. Metabolisme letter utskillelsen av legemidler ved å gjøre de mer hydrofile, og finner hovedsakelig sted i leveren, men også i andre vev, som eksempelvis tarmvegg (11). De fleste legemidler administreres peroralt, og den initielle presystemiske metabolismen skjer ofte i tynntarmen. Absorbert legemiddel, som unnslipper metabolisme i tarmvegg, passerer videre gjennom portvenen til leveren, der ytterligere presystemisk metabolisme kan skje (ofte kalt «førstepassasjemetabolisme») (11). Legemiddel som blir systemisk tilgjengelige vil metaboliseres ved gjentatte passasjer gjennom leveren, og også kunne bli omsatt i andre organer som uttrykker metaboliserende enzymer (11, 12).

Hoveddelen legemidler gis i aktiv form, som omdannes til inaktive metabolitter, unntaket er «prodrugs». Metabolismen fremmer eliminasjonen av legemidler, og følger i prinsippet to trinn som ofte refereres til som fase-1 og fase-2 (13). Fase-1-metabolisme utføres av enzymer som enten oksiderer, reduserer eller hydrolyserer legemidlet til en modifisert utgave med økt vannløselighet. Fase-2-metabolisme av legemidler innebærer som regel konjugering av fase-1-substratet til betydelig mer vannløselig utgave, gjerne med høyere molekylvekt (11).

Individuelle forskjeller i enzymaktivitet er en viktig årsak til variasjon i serumkonsentrasjon til et gitt legemiddel, og det er ikke uvanlig med en variasjon i enzymaktivitet på 10-20 ganger mellom ulike individer (14) Nedsatt enzymaktivitet kan potensielt medføre alvorlige legemiddelbivirkninger, mens økt enzymaktivitet kan resultere i terapivikt. Cytokrom P450

(CYP)-enzymen er generelt de viktigste i metabolisme av legemidler, og nedsatt eller økt aktivitet av slike enzymer kan få store konsekvenser for behandling utfallet.

1.3 Genetisk polymorfisme

Kromosomer er genmateriale plassert i cellekjernen hos mennesker. Cellene inneholder 23 kromosompar. I et kromosom kommer et allel (genvariant) fra mor og et allel fra far. Forskjellige alleler gir variasjon i arvelige egenskaper. Ett par identiske alleler kalles homozygot, mens tilstedeværelse av ulike alleler betegnes heterozygot. Ulike allelvarianter av et gen blir ofte karakterisert ved bruk av «stjerne» (*)-betegnelse, hvor allel betegnelse *1 angir villtypeversjonen av genet (12).

Tilstedeværelse av to eller flere genvarianter kalles polymorfisme. Genetisk polymorfisme refereres til et variantallel som opptrer hyppigere enn 1 % i en normal populasjon (12). Genetisk polymorfisme er en viktig årsak til variasjon i legemiddelrespons (15). Mutasjoner i gener som koder for legemiddelmetaboliserende enzymer kan gi enzymvarianter som har lik, høyere, lavere eller ingen aktivitet i forhold til villtypen. Dersom muterte alleler koder for nedsatt eller økt enzymaktivitet, kan man ved å genotype identifisere nedarvet legemiddelmetaboliserende fenotyper for enzymet som kodes av det aktuelle genet (15).

Når det gjelder CYP-enzymet, deles personer inn i forskjellige CYP-fenotypekategorier basert på deres allelkombinasjon/genotype. Den vanligste inndelingen er homozygot langsomme- (eng. poor metabolizers, PM), intermediære-(intermediate metabolizers, IM), homozygot raske- (eng. extensive metabolizers, EM), ultrasnart- (eng. ultrarapid metabolizers, UM), heterozygot raske- (eng. heterozygous extensive metabolizers, HEM) og heterozygot intermediære-omsettere (eng. heterozygot intermediate metabolizers, HIM).

Ved EM er det ikke funnet noen mutasjoner i genkopiene, dermed ingen defekte alleler, og utviser forventet respons på en standarddose (15). Ved enkeltmutasjonsanalyse betyr *1 at personen ikke har noen av mutasjonene inkludert i metoden, men vedkommende kan ha andre og ofte sjeldne mutasjoner. Vedkommende vil da bli kategorisert som EM, da fravær av variantallel sees på som *1, selv om personen kan ha tilstedeværelse av mer sjeldne mutasjoner. PM har inaktiverende mutasjoner i begge genkopier, som gir to defekte alleler,

og ingen enzymaktivitet. Et aktivt og et allel med nedsatt aktivitet gir HEM. I klinisk praksis har heterozygote mutasjoner varierende betydning, men slike pasienter kan risikere høyere serumkonsentrasjoner. En person med flere enn to aktive alleler defineres som UM, og bryter ned legemidler raskere enn normalt. Det er ikke slik at ethvert CYP-enzym har allelkombinasjoner som kan stratifiseres i alle de overnevnte kategorier. Sistnevnte, UM, er eksempelvis kun aktuelt for CYP2D6 (16). For CYP3A4 er det ingen slike klassifiseringer bruk per dagsdato.

Andelen i en befolkning tilhørende de forskjellige medfødte fenotypekategoriene varierer med etnisitet. Eksempelvis er frekvensen av CYP2D6 UM i befolkningsgrupper på den arabiske halvøy og i Øst-Afrika er omtrent 20 %, mot ca. 2-4 % i Nord-Europa (14, 17).

1.4 Betydning av miljøfaktorer for enzymaktivitet

Legemiddelmetabolisme kan også påvirkes av miljøfaktorer som eksempelvis individets matvaner. Hemmere og indukere av CYP-enzymmer kan forekomme i matvarer, og i enkelte tilfeller kan dette gi toksisitet, og påvirkning på effekten av legemidler. Eksempelvis er komponenter i grapefrukt (eks: naringin, furanokumariner) potente hemmere av CYP3A4 (11, 14). Andre faktorer enn mat og drikke kan også ha effekt på legemiddelmetabolismen som eksempelvis inflammasjon, komorbiditet, hormonstatus og interagerende legemidler (18-20). Interaksjoner med andre legemidler er den kilden til variasjon som vil være enklest å forutse (18). Kjønn er en annen faktor som kan bidra til forskjeller i legemiddelmetabolismen. Det ser ut til at kvinner har høyere CYP3A4-aktivitet sammenlignet med menn, men mekanismen bak er ikke fullstendig fastsatt (21). På grunn av mange variabler vil serumkonsentrasjonsmålinger være et viktig tillegg til genotyping.

1.5 Cytokrom P450-systemet

Cytokrom P450 (CYP) er en gruppe enzymer som er viktige i fase-1-metabolisme av legemidler (14). Navnet «cytokrom» kommer av enzymenes fargepigment, og som gir leveren dens brune farge. Forkortelsen «P-450» stammer fra enzymenes maksimale («peak») absorpsjonsevne av UV-lys ved bølgelengden 450 nm. (14).

Det er identifisert mer enn 50 forskjellige CYP-enzymmer hos mennesker (11, 15). CYP-enzymene deles inn i familier og subfamilier basert på strukturell likhet. CYP-familiene

betegnes med tall (for eksempel CYP3), hvorav familiene 1-3 er ansvarlig for metabolismen av 70-80 % av alle klinisk brukte legemidler som gjennomgår fase-1-metabolisme (15). Hovedfamiliene deles videre inn i underfamilier fra A til E, for eksempel CYP3A (22). De spesifikke enzymene innen en subfamilie angis med et siste tall, for eksempel CYP3A4.

I en studie av alvorlige legemiddelreaksjoner ble omlag 50 % av legemidlene metabolisert av polymorfe CYP-enzymmer (23). Innen legemiddelmetabolisme regnes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 og CYP3A4 som de viktigste CYP-enzymene (15). Genotyping ansees som nyttig ved *CYP2C9*, *CYP2C19* og *CYP2D6*, og utføres rutinemessig flere steder i landet. Den metabolske kapasiteten til disse enzymene er genetisk bestemt, og derfor er genotyping virksomt for disse enzymene (14). Polymorfismer i gener som koder for de sistnevnte enzymene vil være av stor betydning for den terapeutiske effekten av legemidler metabolisert her (15). Genotyping alene er ikke noen god metode for å identifisere om en pasient har rask eller treg metabolisme ved CYP1A2 og CYP3A4. Her er miljøfaktorer av større betydning, og få genetiske faktorer av klinisk relevans er identifisert (14, 24).

I tarmveggen utgjør CYP3A4 mer enn 70 % av total mengde CYP-enzymmer, og tilsvarende 30 % av den totale mengden i lever (15, 25). Hovedparten av enzymmer befinner seg i membranen til endoplasmatisk retikulum (ER) i lever, men også i de fleste andre vev og organer som mage, tarm, lunger, hjerne og lymfocytter er det enzymmer (11). CYP-enzymene er hovedsakelig lokalisert på ER sitt fosfolipidbilag ut mot cytosol. Hydrofobe molekyler kommer inn i cellen og bygges inn i ER sitt lipidbilag. Molekylet oppnår da direkte kontakt med fase-1-enzymmer (11, 15). Alle CYP-enzymene er hemoproteiner, de inneholder et heme-molekyl som er non-kovalent bundet til en polypeptidkjede. Heme-delen binder oksygen i CYP sitt aktive sete, som del av den katalytiske syklusen enzymene utfører (11).

1.6 CYP2D6 og CYP2C19

CYP2D6 er et viktig enzym innen legemiddelmetabolisme, og deriblant er det en rekke antidepressiva som metaboliseres her. CYP2D6 er veldig polymorft, og over 60 variantalleler er beskrevet (26). Bærere av to funksjonelle alleler, enten *1 eller *2, utviser «normal» enzymaktivitet, og klassifiseres som EM. Dette er de to vanligste allelene blant kauasiere. 5-10 % har derimot ingen enzymaktivitet, og omtales PM (*3, *4, *5, *6) (26). *CYP2D6**4 er den vanligste ikke-funksjonelle variantallelen blant kauasiere (26, 27).

Ved metabolisme i CYP2C19 er 2-5 % av kaukasiere PM. I den asiatiske befolkningen er tallet omtrent 20 % (28). PM er forårsaket av *3 og *2, hvor *2 er hyppigst blant kaukasiere (29). *CYP2C19*17* er vist å gi økt metabolismeaktivitet. Denne varianten er sett hos omtrent 18 % av den svenske befolkningen (30). Spesielt homozygote bærere av *17 vil kunne påvirkes av mutasjonen da terapivikt kan oppstå for legemidler metabolisert av dette enzymet. Eksempelvis blir flere av protonpumpehemmerene metabolisert av CYP2C19 (30).

1.7 CYP3A

Det finnes flere isoformer av CYP3A uttrykt hos mennesker, blant annet CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 (15). CYP3A43 finnes kun i lave konsentrasjoner sammenlignet med CYP3A4, og har begrenset betydning for de fleste legemidler. CYP3A7 uttrykkes hovedsakelig i lever hos foster, og ser ut til å ha mindre betydning senere i livet (15). CYP3A4 har lignende substratspesifisitet som CYP3A5, og omsetter dermed mange av de samme legemidlene. Enzymuttrykket mellom de to varierer mellom ulike substrater (31). Om lag 20 % av kaukasiere uttrykker CYP3A5, betegnet som bærere av minst ett *CYP3A5*1*-allel (32, 33). Individuer som ikke har *1-allel, men bærer av to ikke-kodede alleler (oftest *3), tilhører kategorien homozygot langsomme omsettere og utviser ingen enzymaktivitet. Andelen individer som bærer *1-allelet (fravær av annen målt mutasjon) varierer mellom ulike befolkningsgrupper. *CYP3A5*3* representerer den vanligste polymorfismen blant kaukasiere (33, 34).

CYP3A5 spiller en mindre rolle for den totale CYP3A-enzymaktiviteten hos store deler av befolkningen, men kan fortsatt være av betydning for enkeltindividet (35, 36). Hvordan *CYP3A5*-genotype påvirker legemiddelinntak sees eksempelvis ved bruk av legemidlet takrolimus hvor tilstedeværelse av minst et *CYP3A5*1*-allel er den sterkeste genetiske prediktoren for takrolimuseksponering (37-39). Personer med minst ett *CYP3A5*1*-allel trenger høyere dose enn bærere av *CYP3A5*3/*3* (33). Det samme er sett hos hjertetransplanterte ved bruk av takrolimus, hvor personer uten funksjonell CYP3A5 må ha lavere doser enn de med *1-allelet. Lesche *et al.* viste at sistnevnte krevde omtrent 2,2 - 2,6 ganger høyere daglig dose enn de med ikke-funksjonell CYP3A5 (37).

CYP3A4 er med høy sannsynlighet det viktigste enzymet i omsetning av legemidler, og involveres i metabolismen av omkring halvparten av legemidler som oksideres (22, 40). Det er vanlig med 30-40 % variasjon i clearance mellom ulike individer ved slike substrater grunnet variasjonen i enzymaktivitet (12).

Flere enn 20 ulike allelvarianter av CYP3A4-enzymet er identifisert (15). Genetiske polymorfismer i *CYP3A4* som gir økt og nedsatt aktivitet er definert, men med lav frekvens i befolkningen. Alene kan ikke disse polymorfismene forklare forskjellen i CYP3A4-aktiviteten (14, 15, 41). Genotypene til *CYP3A4* og *CYP3A5* forklarer kun en liten prosent av inter-individuell variasjon i dose/konsentrasjons-ratio (42). På tross av dette finnes det noen unntak hvor genetisk variasjon er av betydning: *CYP3A5*3* og *CYP3A4*22* (43). *CYP3A4*22*-polymorfismen er vist at reduserer CYP3A4-aktivitet hos mennesker ved ulike legemidler som simvastatin, quetiapin, atrovastatin og takrolimus (41, 44-46). I nyretransplanterte ble det demonstrert at individer som var bærer av ikke-funksjonell CYP3A5, og hadde et *CYP3A4*22*-allel, fikk nedsatt CYP3A4-aktivitet, og 50 % lavere dosebehov av takrolimus (39). *CYP3A4*1/*22* er dermed assosiert med redusert CYP3A4-aktivitet (41, 44). Til tross for at det i flere studier er rapportert nedsatt CYP3A4-aktivitet er allelfrekvensen i kaukasiere forholdsvis lav, 5-7 %. Dette begrenser den totale påvirkningen på CYP3A4 variabilitet, men vil likevel betegnes som klinisk relevant for dem som besitter genet (18, 44).

En stor del av fenotypisk variabilitet har så langt ikke genetiske assosiasjonsstudier kunne forklare. 60-90 % av variasjonen i CYP3A4-aktivitet er foreslått å være under genetisk kontroll (47, 48), og uidentifiserte genvarianter av *CYP3A4*, eller andre utenforstående gener kan påvirke variabiliteten sett i CYP3A4-fenotype.

1.8 Regulering av CYP3A-aktivitet

Regulering CYP3A-fenotype er veldig kompleks og inkluderer blant annet kjernereseptorer og andre transkripsjonsfaktorer, hormoner, inflammasjon, heme og proteinsyntese og andre gener lokalisert utenfor CYP3A som kan påvirke CYP3A-fenotypen (18). Potensiell innflytelse på CYP3A-fenotype fra ulike polymorfismer i disse genene har blitt studert de siste årene. En studie har vist at genvarianter av peroksisom proliferatoraktivert reseptor α (PPAR α) og P450 oksidoreduktase (POR) kan påvirke CYP3A-fenotype i form av endret

dose-justert blodkonsentrasjon av takrolimus og ciklosporin (49). PPAR α ser ut til å være involvert i regulering av CYP3A-uttrykk i lever hos mennesker. To PPAR α sekvensvarianter (rs4253728 og rs4823613) kan være med å forklare noe av den individuelle variasjonen i uttrykkelse og aktivitet av hepatisk CYP3A (24). Klein *et al.* viste at hver av dem forklarer ca. 5 % og 9 % av variasjonen i CYP3A-fenotypen *in vivo* (24).

POR er et protein bestående av 680 aminosyrer, og har *in vivo* sett ut til å kunne påvirke CYP-mediert metabolisme, inkludert CYP3A isoenzymer (43). Når legemidler oksideres av CYP-enzymet overfører POR H⁺ til CYP-enzymet i nærvær av O₂ i ER. Hoveddelen av legemidler blir oksidert av mikrosomale CYP-enzymet, som krever POR for at elektronoverføringen skal fungere (11). Grunnet denne funksjonen vil forstyrrelser i POR-aktivitet kunne gi forskjeller i legemiddelmetabolismen, men resultatene av studier på POR ser ut til å være sprikende. Derimot kan POR sin sentrale rolle *in vivo* bekreftes av embryodødelighet i «POR-knockout» mus (50). *POR*-genet er veldig polymorft, og mer enn 130 aminosyreforandringer er foreløpig identifisert (43, 51). Det er foreløpig ikke klarlagt hvilket forhold mellom POR og CYP-enzymet som gir best metabolisme.

Den vanligste polymorfismen i *POR* er sekvensvarianten *POR*28* (rs1057868), som koder for aminosyren A503V (52). Det er rapportert en allelfrekvens for *POR*28* på omtrent 30 %, i midlertidig med en viss variasjon avhengig av etnisitet (33, 52). Elens *et al.* rapporterte at individer med funksjonell CYP3A5 og *POR*28* variantallel *in vivo* er assosiert med en lavere CYP3A5-aktivitet mot midazolam sammenlignet med *POR*1/*1*-pasienter. Sammenhengen ble ikke sett hos individer som har ikke-funksjonell CYP3A5 (43). En annen studie viste at *POR*28*-allelet er forbundet med økt *in vivo* CYP3A5 aktivitet mot takrolimus hos personer som uttrykker CYP3A5 (53). Videre ble det ikke vist noen effekt på CYP3A4-metabolisme, med mindre individet hadde ikke-funksjonell CYP3A5, da ga homozygot *POR*28* økt CYP3A4-aktivitet mot både takrolimus og ciklosporin (53). I flere studier er individer med funksjonell CYP3A5 og *POR*28*-allel assosiert med å behøve høyere takrolimusdose for å nå terapeutiskvindu enn de uten *POR*28* (33, 49). Bærere av ikke-funksjonell CYP3A5*3/*3 påvirker takrolimusdoseringen ved at pasientene trenger lavere doseringer, og det ser ut til at *POR*28* kan bidra til den observerte variabiliteten (37). For øvrig er det ikke klart om *POR*28* har noen effekt på CYP3A4-aktivitet, blant annet har en studie rapportert at *POR*28* ikke ga noen effekt på CYP3A4-mediert metabolisme av erytromycin og midazolam

(43). En annen studie har vist at *POR*-genotyper kan påvirke CYP3A4-aktivitet på en substrat spesifikk måte (54).

*POR*28* har vist ulike resultater mellom *in vivo* og *in vitro* resultater (37). Alt sett i sammenheng ser *POR* ut til å være avhengig av både CYP isoenzym og substrat. *POR* varianter er komplekse, men kan potensielt være en kilde til genetisk variasjon i CYP3A-fenotype. Det ser ut til at *POR*28* kan være med å forklare noe av den inter-individuelle variasjonen i CYP3A-fenotype. Flere studier er nødvendig for en mer fullstendig kartlegging av forbindelsen mellom genotypene av *POR* og *CYP3A*.

1.9 Biomarkører for CYP3A-fenotype

En rekke endogene substanser er foreslått som potensielle biomarkører for metaboliserende enzymer, da genotyping alene ikke anses optimalt for å forutsi CYP3A4/5-fenotype. En fenotypisk biomarkør vil reflektere både genetikk og miljø. En stor andel legemidler blir metabolisert av CYP3A, og derfor vil det være spesielt nyttig å finne en biomarkør for disse enzymene (43, 55). Fenotypiske biomarkører er nyttig for å få informasjon om aktiviteten til legemiddelmetaboliserende enzymer, og videre kunne dosere et legemiddel mer nøyaktig enn dagens metoder (56). Bruk av takrolimus etter nyretransplantasjon er et eksempel hvor effekten de første dagene etter transplantasjonen er avgjørende. Forutses den farmakokinetiske oppførselen til takrolimus ved hjelp av biomarkører vil dette kunne være med på optimaliseringen av dosen de første dagene (57). Det er foreslått både endogene og eksogene markører.

Flere CYP3A-substrater deriblant midazolam, erytromycin, alprazolam og nifedipin har blitt foreslått som potensielle biomarkører for CYP3A-aktivitet (56, 58). Midazolam sin metabolske clearance til 1-OH-midazolam brukes som biomarkør for CYP3A-aktivitet (58-60). Legemiddelindustrien har lenge brukt midazolam-clearance hos friske frivillige før og etter inntak av nye legemidler for å teste om legemidlet potensielt induserer eller hemmer CYP3A4 (59). Etter en oral dose midazolam har farmakokinetikken vist seg lineær ved store doseforskjeller. Kun små doser er nødvendig for måling av total CYP3A-aktivitet (61). Videre er en metabolitt av legemiddelet kinin blitt testet, og vist gode resultater som stabil markør for aktivitet i CYP3A4 (62). Hovedproblemet med eksogene markører er at pasienter

må gis legemidler de ikke trenger, og dette kan sees på som en ekstra belastning for den det gjelder.

For å unngå den ekstra belastningen kan endogene markører være et bedre alternativ. Endogene markører fremstår som en tryggere og mindre invasiv metode for å forutse CYP3A-fenotype. Flere endogene substanser har blitt foreslått som potensielle kandidater, blant annet en rekke oksiderte kolesterolsubstanser naturlig forekommende i sirkulasjonen hos mennesker. Det er blant annet mye 4 β -hydroksykolesterol i plasma (4 β -OH-K) og denne substansen har blitt foreslått som potensiell biomarkør sammen med 6 β -hydroksykortisol (6 β -OH-F) (55, 63, 64).

CYP3A-enzymene katalyserer oksideringen av kortisol til 6 β -OH-F, som videre utskilles i urinen (64). 6 β -OH-F:kortisol ratio i urin er tradisjonelt brukt som en tryggere markør for CYP3A-aktivitet enn tidligere metoder med eksogene markører (65, 66). Ratioen ser ut til å være en god metode, men på grunn av stor inter-individuell variasjon i kortisolmetabolisme er det viktig at kortisol i urin blir evaluert i samme pasient som ratioen (64, 65).

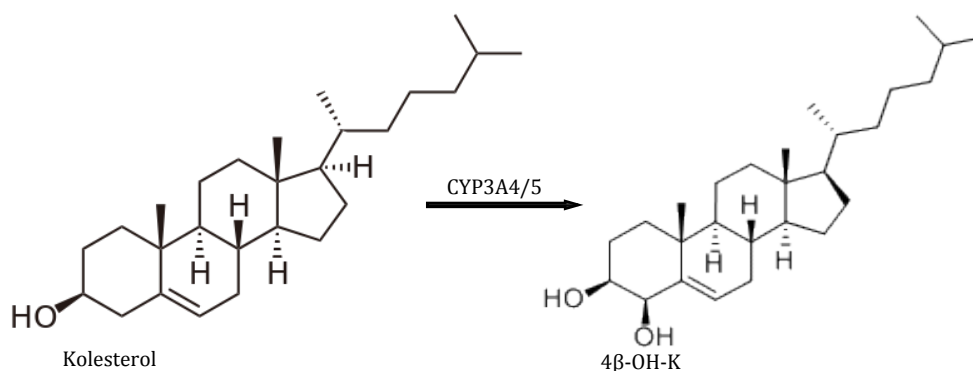
1.10 4 β -hydroksykolesterol

I 2001 observerte Bodin *et al.* sterkt forhøyede konsentrasjoner av 4 β -OH-K hos pasienter behandlet med de antiepileptiske legemidlene fenobarbital, karbamazepin og fenytoin, som er kjente indukere av CYP3A4/5, CYP1A2, CYP2B6 og CYP2C9. Disse enzymene ble undersøkt for kolesterol-metaboliserende egenskaper (63). 4 α -hydroksykolesterol (4 α -OH-K) ble også undersøkt, men konsentrasjonen av 4 α -OH-K var lavere enn 4 β -OH-K, og ble ikke påvirket av behandling med antiepileptika på samme måte som 4 β -OH-K (63, 67). CYP3A4 viste seg å konvertere kolesterol til 4 β -OH-K, og lite blir formet ved den alternative mekanismen autooksidering (figur 1.) (63, 68). 4 β -OH-K blir ikke bare dannet av CYP3A4, men også CYP3A5 (34). Enkelte indukere av CYP3A4/5, som eksempelvis karbamazepin, er vist å kunne forårsake en øking på omtrent 10 ganger i serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K (63). En motsvarende, men relativt sett mindre reduksjon er sett ved behandling av legemidler som er CYP3A4/5-hemmere (69).

4 β -OH-K er en sterk kandidat som endogen biomarkør for CYP3A4/5-aktivitet (34, 70).

Dutreix *et al.* har publisert en studie hvor de sammenligner 6 β -OH-F/kortisol-ratio i urin og

4 β -OH-K i plasma for monitorering av CYP3A4-aktivitet. Det ble vist at 6 β -OH-F er en bedre markør for raske endringer, og 4 β -OH-K er mer stabil over tid (71). 4 β -OH-K har lang halveringstid, hele 17 dager, og konsentrasjonen hos den enkelte er stabil over lengre perioder (55). Dette kan være positivt, men vil samtidig bety at det ikke er en god markør hvis raske endringer i CYP3A-aktivitet skal følges (55, 67). 4 β -OH-K foreligger enten i fri form eller esterifisert til lange fettkjeder, hvorav det er mest av sistnevnte (63). Måling av 4 β -OH-K er nyttig også hos pasienter med nyresvikt da kinetikken til 4 β -OH-K ikke påvirkes av nyrefunksjon (68). Det er omdiskutert om 4 β -OH-K alene er en god nok markør, eller om ratio 4 β -OH-K/kolesterol er bedre. Korrelasjonen mellom plasmanivået av 4 β -OH-K og kolesterol er svak, og kun 9 % av variasjonen i 4 β -OH-K var grunnet variasjon i kolesterolkonsentrasjon (34).



Figur 1. Omdannelsen av kolesterol til 4 β -OH-K via CYP3A4/5.

Serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K hos friske voksne ligger i området mellom 50-125nmol/L (34, 70). Nøyaktig hva som forårsaker den individuelle variasjonen i serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K er lite kjent, men faktorer som blant annet etnisitet og kjønn kan gi individuelle variasjoner i 4 β -OH-K (34). I hvilken grad genetisk variasjon i *CYP3A4/5* og *POR* kan bidra til å forklare den inter-individuelle variasjonen i serumkonsentrasjonen til 4 β -OH-K er lite undersøkt. Noen studier på emnet er utført, deriblant har en studie på polymorfismer i *CYP3A5* vist at plasmakonsentrasjonen av 4 β -OH-K i stabile nyretransplanterte er relatert til polymorfismer i *CYP3A5* (58). Dermed kan genotyper til *CYP3A5* bidra til inter-individuell variabilitet i CYP3A-aktivitet (58). Studien var kun utført på en liten populasjon (n=45), og det er ikke kjent i hvilken grad variasjonen bidrar til forskjeller i 4 β -OH-K. PPAR og POR demonstrerer at variabilitet i CYP3A4, hvert fall delvis bestemmes av polymorfismer utenfor CYP3A. Hvordan disse påvirker 4 β -OH-K er derimot

ikke kjent. Flere studier om hvordan 4 β -OH-K nivået påvirkes av ulike genotyper av *CYP3A4/5* og polymorfismer utenfor *CYP3A* vil være nyttig i bekræftelsen av 4 β -OH-K som biomarkør.

1.11 Hensikt

Hensikten med denne studien var å undersøke betydningen av *CYP3A4/5*-genotyper for *CYP3A*-fenotype målt som nivå av 4 β -OH-K. Videre ble også betydningen av variantallelet *POR*28*, som tidligere har vist varierende effekt på metabolisme av *CYP3A*-substrater, undersøkt med hensyn til 4 β -OH-K nivåer hos individer med forskjellige genotyekombinasjoner av *CYP3A4/5*.

2 Metode

2.1 Materiale

Studien tok utgangspunkt i biobankede serum- og fullblodprøver ved Senter for Psykofarmakologi (SFP). SFP utfører monitorering av legemiddelkonsentrasjoner og farmakogenetiske analyser, der blodprøvene til sistnevnte analyser lagres i biobank. Serumprøver analysert ved SFP i perioden 8. januar til 14. juli 2014 fra pasienter, der det eksisterte blodprøver for DNA-analyse i biobank, ble lagt til side uavhengig av kjønn og alder for analyse for 4 β -OH-K. Dersom det var analysert flere serumprøver fra samme person i løpet av perioden, ble en tilfeldig prøve inkludert. Pasientene gikk hovedsakelig på legemidler assosiert med psykiatri og epilepsi (tabell 2.1).

Legemiddel	Antall personer	Legemiddel	Antall personer
Alprazolam	14	Mianserin	2
Amisulprid	5	Mirtazapin	2
Aripiprazol	17	Nortriptylin	2
Bupropion	5	Venlafaksin	14
Citalopram	4	Oksazepam	1
Diazepam	1	Olanzapin	24
Duloksetin	3	Paroxetin	2
Escitalopam	43	Perfenazin	12
Fluoxetin	47	Paliperidon	45
Flupentiksol	1	Quetiapin	12
Gabapentin	1	Risperidon	19
Haloperidol	4	Ritalin	9
Klomipramin	1	Sertralin	7
Klonazepam	1	Topiramamat	1
Klorprotiksen	1	Tramadol	3
Klozapin	25	Valporat	8
Lamotrigrin	31	Ziprasidon	2
Levetiracetam	2	Zolpidem	3
Levomepromazin	2	Zolpiclon	11
Litium	1	Zuklopentiksol	12

Tabell 2.1 Oversikt over ett av legemiddelene rekvirert for serumkonsentrasjonsbestemmelse per person (n=400)

Totalt ble 400 serumprøver inkludert for analyse for 4 β -OH-K i denne masteroppgaven. Fra de samme pasientene ble DNA-prøver fra biobanket fullblod genotypet med tanke på tilstedeværelse av *CYP3A4**22 (15389C>T), *CYP3A5**3 (6986A>G) og *POR**28 (1508C>T). Serumkonsentrasjonsbestemmelse av 4 β -OH-K ble utført ved SFP av masterstudenten, mens genotyping ble utført ved Avdeling for Medisinsk Biokjemi, OUS-Rikshospitalet, i regi av PhD/forsker Sara Bremer.

CYP2D6- og *CYP2C19*-genotyper var lagret i legemiddelmonitoreringsdatabasen SWISS-lab ved SFP for de pasientene det tidligere var utført farmakogenetisk analyse på. Opplysninger om disse to enzymene, pasientenes alder og kjønn ble hentet fra SWISS-lab, og lagret i Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

For alle de inkluderte serumprøvene ble tilhørende rekvisisjoner fra legene gjennomgått for å identifisere eventuell bruk av legemidler som var indukere eller hemmere av *CYP3A4/5*. Aktuelle hemmere og indukere som ble kartlagt var basert på interaksjonstabellen publisert på hjemmesiden til Division of Clinical Pharmacology, Indiana University (tabell 2.2) (72).

CYP3A4/5

Hemmere	Indusere
klaritromycin, erytromycin, fluconazol, diltiazem, amiodarone, ciprofloxacin, imatinib, norfluoxetin, verapamil, sjernefrukt, grapefrukt, indinavir, ritonavir	Barbiturater, karbamazepin, glukokortikoider, oxkarbamazepin, fenyntion, rifampin, johannesurt, nevirapine, pioglitazon

Tabell 2.2 Oversikt over indukere og hemmere som ble kartlagt ved hjelp av rekvisisjonene.

I tillegg til gjennomgangen av rekvisisjonsskjemaene ble serumprøver med en målt verdi av 4 β -OH-K over 250 nmol/L, uten registret bruk av enzyminduser, rutinemessig screenet for eventuell tilstedeværelse av enzyminduserende antiepileptika ved standard analysemetode for antiepileptika ved SFP. Dette ble gjort for å identifisere mulig komedikasjon med enzymindusere, som fenobarbital, karbamazepin og fenytoin, ikke angitt på rekvisisjonsskjema. Grenseverdien på 250 nmol/L for 4 β -OH-K ble valgt, ettersom en tidligere masteroppgave ved SFP hadde målt verdier over denne grensen for alle pasienter kombinasjonsbehandlet med karbamazepin (73). Pasienter hvor det ble påvist kombinert bruk av *CYP3A4/5*-hemmere eller -indusere ble ekskludert fra de senere statistiske analysene.

2.2 Serumkonsentrasjonsmålinger av 4 β -OH-K

For bestemmelse av 4 β -OH-K-konsentrasjonen ble serumprøvene reanalyisert ved hjelp av et væskechromatografisystem av typen Aquility «ultra performance liquid chromatography» (UPLC), koblet til Micromass Quattro Premier tandem massespektrometrisk (MS/MS) detektor fra Walters (Milford, MA, USA). Analyse av 4 β -OH-K ble gjennomført ved SFP ved en tidligere validert metode. Grunnet utfellingsreaksjoner ble det utført en modifisering fra den opprinnelige metoden, hvor det ble lagt til et filtreringstrinn. Før analyse hadde serumprøvene blitt oppbevart i fryser med temperatur -20 °C.

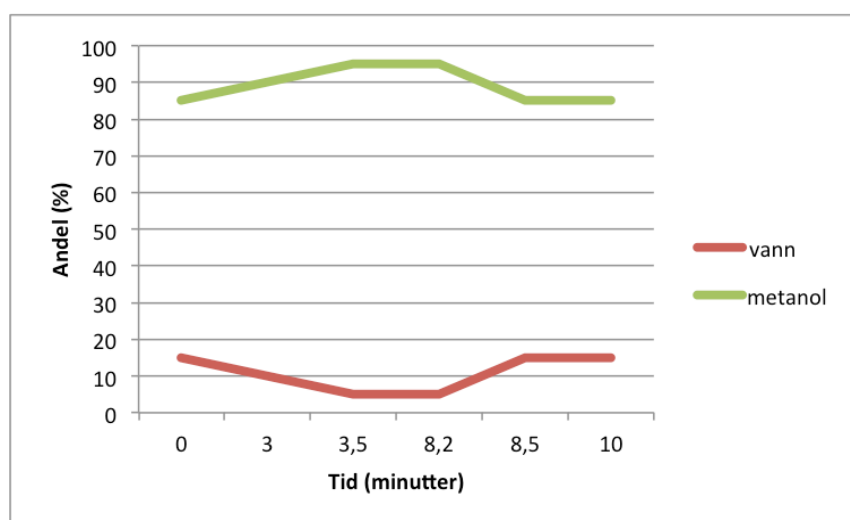
2.2.1 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelsen ble utført ved en væske-væske ekstraksjon. Først ble 500 μ L serumprøve tilsatt 50 μ L av en 10 μ M metanol-løsning av 4 β -hydroksykoolesterol-d7, som ble benyttet som intern standard i metoden (leverandør Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada). Prøven ble deretter mikset grundig og tilsatt 1 mL av 1 M nylaget natriummetoksid løst i etanol. Blandingen av serum, internstandard og natriummetoksid sto i romtemperatur 20 minutter for fullstendig hydrolysering av esterbindinger mellom 4 β -OH-K og lange fettsyrer i serum.

Selve væske/væske-ekstraksjonen ble så utført ved tilsetning av 1 mL vann og 4 mL heksan til den hydrolyserte prøven. Denne blandingen ble vendt i 2 minutter for ekstraksjon av 4 β -OH-K fra vannfasen til organisk fase. For å oppnå fullstendig faseparasjon mellom hydrofil og hydrofob væskefase ble løsningen sentrifugert med 2500 omdreininger i 5 minutter ved 20 °C. Blandingen sto deretter 25 minutter i fryseren ved -80 °C, for oppnåelse av totalt innfrost vannfase. Den organiske fasen ble overført til nytt reagensrør, og inndampet ved 37 °C med en lett nitrogengass-spray til fullstendig tørrhet, omtrent 25 minutter. Tørrstoffet ble videre reløst i 500 μ L metanol og ristet. Løsningene ble overført til små filtterrør (Costar ® Spin-x HPLC Micro Centrifuge Filter, 0.2 μ m Nylon Filter). Filtterrørene ble plassert 15 minutter i fryseren ved -20 °C for å fremprovosere eventuelt ytterligere utfelling av restkomponenter i prøvene. Deretter filtreres blandingen gjennom filteret ved sentrifugering med 2500 omdreininger i 6 minutter ved 2 °C. Etter sentrifugering ble løsningen pipettert over til vialer, korket og plassert i autosampler for analysering ved UPLC-APCI-MS/MS-analyse.

2.2.2 UPLC-APCI-MS/MS-analyse

For å kvantifisere 4 β -OH-K ble en standardkurve opprettet med 50 μ L 10 μ M internstandard, 400 μ L metanol og 50 μ L standardløsninger i konsentrasjonene 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 12000 og 16000 nmol/L. Separering av stoffene ble utført av en Aquility UPLC BEH Shield C18-kolonne (1.7 μ m, 1.0 x 100 mm; Walters) med kolonnetemperatur 40 °C. Ti μ L ble injisert og analysertiden per prøve var totalt 10 minutter. Mobilfasen besto av vann og metanol med gradienteluering (figur 2.1) startet i forholdet 15:85.



Figur 2.1 Sammensetningen til mobilfasen under UPLC-APCI-MS/MS-analysen.

Mobilfasehastigheten var 0,150 ml/min. Ionekilden mellom kolonnen og MS/MS-detektoren var en atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-probe (tabell 2.1).

Tabell 2.1 Spesifikasjoner for «atmospheric pressure chemical ionization (APCI)»- probe innstilt i positiv mode ved bruk av MS/MS-detektor.

Temperatur i ionekilde	130 °C
Temperatur ved frigjøring av analytt fra frie ioner i mobilfasen	600 °C
Elektrisk spenning på APCI-nålen	10 μ A
Gassgjennomstrømning på prøvekolen	90 L/t
Gassgjennomstrømning ved frigjøring av analytt fra frie ioner i mobilfasen	600 L/t

Følgende masseoverganger ble benyttet ved hjelp av «multiple reaction monitoring» (MRM) i MS/MS-detektoren for å detektere internstandard og 4 β -OH-K:

- $4\beta\text{-OH-K } m/z \ 385.25 \rightarrow 367.45$
- $4\beta\text{-OH-K-d}_7 \ m/z \ 392.30 \rightarrow 374.50$

Programvaren brukt til dataanalysen var Waters MassLynx. Toppene i kromatogrammene ble integrert, og ratio mellom topphøyden til analytt og internstandard ble brukt som respons. Gjenfinning av intern standarden var på mellom 60-100 %. Retensjonsstiden i kromatogrammet var tilnærmet lik for $4\beta\text{-OH-K}$ og d_7 -merket internstandard (ca. 3.1 minutter). Laveste validerte konsentrasjon ble brukt som nedre kvantifiseringsgrense (eng. 'lower limit of quantification' LLOQ) og var for metoden 25nmol/L. Analysemetoden var validert for presisjon og nøyaktighet i konsentrasjonsområdet 25- 1600 nmol/L. Ved hver analyse ble det analysert humane blankserumprøver. Serumkonsentrasjonsanalysene av $4\beta\text{-OH-K}$ ble utført over 13 dager i november 2014 og januar 2015.

2.3 Genotyping

Isolering av DNA og farmakogenetisk analyse av kandidatgener (*CYP3A4/5* og *POR*) ble som nevnt tidligere utført ved OUS-Rikshospitalet. Under følger en kortfattet metodebeskrivelse for analysene som ble gjennomført.

DNA ble ekstrahert fra blod ved å bruke MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) på MagNA Pure LC instrument (Roche). Dette er et automatisert system som består av instrument, data, programvare og kit med reagens. Fremgangsmåten for isolering ble gjort etter DNA blood cells performance-protokoll som beskrevet av produsenten (Roche Applied Science).

CYP3A4, *POR* og *CYP3A5*-genotyping ble utført ved bruk av real-time polymerase chain reaction (sanntids-PCR) og smeltekurveanalyse med allel-spesifikk hybridiseringsprobe på LightCycler® 480 instrument (Roche Applied Science). Fravær av variantallel ble sett på som villtype allel (*I).

2.4 Endepunkter og statistiske analyser

For å evaluere betydningen av de ulike polymorfismene i *POR*, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP3A4* og *CYP3A5* for serumkonsentrasjonen av $4\beta\text{-OH-K}$ ble studiepopulasjonen stratifisert i undergrupper. Betydningen av de ulike polymorfismene for serumnivå av $4\beta\text{-OH-K}$ ble

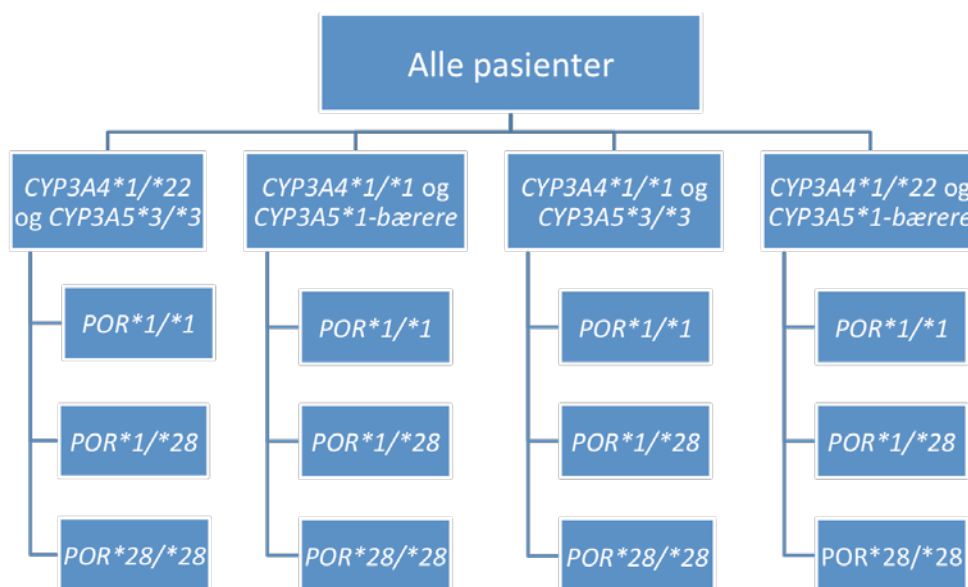
evaluert statistisk ved Mann-Whitney U test i GraphPad Prism versjon 4 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). GraphPad Prism ble brukt for utarbeidelse av grafiske framstillinger og de statistiske analysene. P-verdier under 0.05 ble ansett som statistisk signifikant.

Genotypene til *CYP2C19* og *CYP2D6* ble stratifisert i undergrupper etter allel-type. Ved *CYP2D6* ble pasienter klassifisert som PM dersom individet hadde to defekte alleler (*def*: et variantallel med påvist: *3-, *4, *5- eller *6-mutasjon som koder for defekt enzymaktivitet i *CYP2D6*), HEM hvis *1/*def*, IM *red/red* (*red*: et variantallel med påvist: *9-, *10- eller *41-mutasjon som koder for redusert enzymaktivitet), HIM *1/*red*, EM *1/*1 (homozygot fravær av analysert mutasjon, antatt «villtype»), og UM dersom flere enn 2 aktive allelkopier. Dersom alleltypen ikke kunne deles i en av de overstående gruppene ble de klassifisert etter allel-funksjonen: *def/red*.

CYP2C19 ble delt i lignende undergrupper: EM var *1/*1, HEM *1/*def* (*def*: et variantallel med påvist: *2-, *3- eller *4- mutasjon som koder for defekt enzymaktivitet i *CYP2C19*), PM *def/def*. De resterende ble delt i grupper etter *1/*økt* (*økt*: et variantallel med påvist *17-mutasjon som koder for økt enzymaktivitet i *CYP2C19*), *økt/økt* og *def/økt*. Det ble videre utført statistiske sammenligninger mellom de ulike gruppene, for å undersøke om det er noen sammenheng mellom mutasjoner i *CYP2D6/2C19* for serumkonsentrasjon av 4β-OH-K.

CYP3A4 og *CYP3A5* ble kategorisert i følgende genotypegrupper; *CYP3A4**1/*1, *CYP3A4**1/*22, *CYP3A5**1/*3, *CYP3A5**1/*1, *CYP3A5**3/*3. Det ble utført statistiske analyser innad mellom genotypene i *CYP3A4*, *CYP3A5* og *POR*. Hvor *1-gruppene ble sett på som kontrollgruppen.

Grunnet varierende data, og usikker effekt av *POR*-genotyper for *CYP3A*-fenotype ble ulike genotyekombinasjoner undersøkt for sammenheng med serumkonsentrasjon av 4β-OH-K. Det ble utført sammenligninger mellom definerte genotyekombinasjoner. For analyser av genotyekombinasjonene ble *CYP3A5*-genotyper definert i to grupper, enten *CYP3A5**3/*3 eller bærer av minst ett *CYP3A5**1-allel. *CYP3A5* og *CYP3A4* genotypene ble delt i fire grupper, som videre ble delt inn i tre undergrupper avhengig av *POR*-genotypen (*1/*1, *1/*28 og *28/*28, figur 2.2). De tre undergruppene med *POR*-genotyper ble sammenlignet statistisk.



Figur 2.2 Flytskjema over hvordan genotypene ble inndelt.

Det ble i tillegg postulert at serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K <50 nmol/L muligens kunne definere en subgruppe med lav CYP3A-aktivitet. En sammenligning av andel pasienter med genotipekombinasjonene *CYP3A4*1/*22* + *CYP3A5*3/*3*, som koder for endsatt CYP3A-fenotype, blant annet personer med 4 β -OH-K-konsentrasjon <50nmol/L versus >50nmol/L ble derfor utført. Fisher`s exact test ble benyttet for å sammenligne disse andelene(GraphPad), og resultatene presentert som odds ratio med 95 % konfidensintervall (KI).

Til sist ble det også undersøkt kjønn og alder kunne bidra til variabiliteten i 4 β -OH-K serumkonsentrasjonsnivået. I hvilken grad 4 β -OH-K var knyttet til alder ble evaluert ved hjelp korrelasjonsanalyse (Spearman test i GraphPad), mens effekten av kjønn ble undersøkt ved hjelp av ikke-parametrisk Mann Whitney test (GraphPad).

2.5 Etikk og godkjenninger

Reanalyseringen av 4 β -OH-K i pasientprøver var forhåndsgodkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK-referansenr: 2014/1191-1) og Forskningsutvalget ved Diakonhjemmet Sykehus. Medlemmene av prosjektet fikk tilgang til

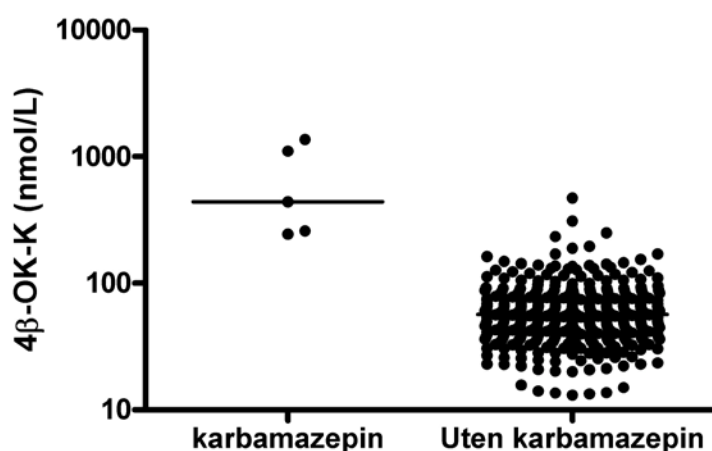
pasienters legemiddelbruk i pasientdatabasen SWISS-LAB. For å forhindre at sensitiv informasjon kom på avveie ble personlige opplysninger som ikke var anonymisert kun behandlet og oppbevart på lokal PC ved Senter for Psykofarmakologi.

3 Resultater

3.1 Materialbeskrivelse

Studien inkluderte 400 pasienter, deriblant 220 kvinner og 180 menn.

Serumkonsentrasjonene av 4 β -OH-K viste 104 ganger variasjon (13.1-1370 nmol/L) i det reanalyserte pasientmaterialet. 21 av prøvene hadde konsentrasjoner under LLOQ, og disse verdiene vil det være knyttet noe større usikkerhet til, men de ble likevel tatt med i beregningene. 3 pasienter ble bekreftet komedisinert med karbamazepin ved hjelp av SWISS-lab ved SFP. Utover dette hadde 5 pasienter 4 β -OH-K-konsentrasjoner over 250 nmol/L. Hos to av individene ble det bekreftet karbamazepin i serum ved antiepileptika-screeningen. Totalt 5 pasienter ble bekreftet komedisinert med karbamazepin, og dette gjenspeilet seg i 4 β -OH-K-konsentrasjonene som var signifikant forhøyet, hhv. 1107.4, 245.3, 259.8, 441.4 og 1370 nmol/L (=0.0001) (figur 3.1) De komedisinerte pasientene ble ekskludert fra alle senere analyser.



Figur 3.1 Spredning av 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K)-konsentrasjonen mellom karbamazepin brukere og ikke brukere av karbamazepin. Linjene markerer median, hhv 441.4 og 56.6 nmol/L (p=0.0001). Y-aksen med 4 β -OH-K-konsentrasjonene er logtransformert (n=400).

Etter ekskludering var 395 pasienter inkludert, hvor median i alder var 44 år og median 4 β -OH-K-konsentrasjon var 56.6 nmol/L. Det var en signifikant forskjell i 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom menn og kvinner (p=0.0001, se tabell 3.1).

Tabell 3.1 Deskriptive data av hele pasientgruppen, ekskludert pasienter bekreftet komedisinert med induser av CYP3A4/5 (n=395)

	Menn	Kvinner	p-verdi
Antall	178	217	-
Median alder (spredning)	37 år (6, 80)	48 år (13, 98)	-
Median 4β-OH-K-konsentrasjon i nmol/L (Spredning)	50.0 (13.1, 233.6)	63.2 (14.1, 472.2)	<0.0001*

*Statistisk signifikant forskjell i mediankonsentrasjon mellom kvinner og menn (p< 0.0001)

3.2 Deskriptive data og fenotypefordeling

Deskriptive data og fenotypefordeling med tilhørende 95 % konfidensintervall (KI) for de inkluderte prøvene er vist i tabell 3.2-3.6. Varierende inkludert pasientantall skyldes manglende data i SWISS-lab vedrørende CYP2D6 og CYP2C19. Videre manglet det fullblod for 10 pasienter i biobanken, og dermed ble disse ekskludert fra analyserer vedrørende POR, CYP3A4 og CYP3A5.

Tabell 3.2 Frekvensandel av ulike CYP2D6-genotyper med tilhørende KI og median 4β-OH-K-konsentrasjon i de ulike genotypene (n=393).

CYP2D6-genotype	Antall	Median 4β-OH-K-Konsentrasjon i nmol/L (spredning)	Andel	95 % KI
EM	170	59.4 (13.7, 310.8)	0.433	(0.385-0.482)
PM	31	53.7 (13.4, 126.8)	0.079	(0.056-0.110)
Def/red	26	43.8 (23, 107.5)	0.066	(0.045-0.096)
HEM	104	55.5 (20, 188.6)	0.264	(0.223-0.310)
HIM	40	59.2 (13.1, 138,2)	0.102	(0.075-0.136)
IM	4	73.1 (25.7, 97.5)	0.01	(0.003-0.027)
UM	18	58.4 (13.6, 91.5)	0.046	(0.029-0.072)

Tabell 3.3 Frekvensandel av ulike *CYP2C19*-genotyper med tilhørende KI og median 4 β -OH-K-konsentrasjon i de ulike genotypene (n=289).

<i>CYP2C19</i> -genotype	Antall	Median 4 β -OH-K-konsentrasjon i nmol/L (spredning)	Andel	95 % KI
EM	110	53.0 (13.1, 310.8)	0.381	(0.327-0.438)
HEM	72	57.3 (15.7, 251)	0.249	(0.203-0.302)
Norm/økt	74	60.5 (13.6, 196.1)	0.256	(0.209-0.309)
PM	13	63.7 (29.6, 136)	0.045	(0.026-0.076)
Økt/økt	4	61.8 (58.6, 70.9)	0.014	(0.004-0.036)
Def/økt	16	45.9 (15, 131.5)	0.055	(0.034-0.089)

Tabell 3.4 Frekvensandel av ulike *CYP3A5*-genotyper med tilhørende KI og median 4 β -OH-K-konsentrasjon i de ulike genotypene (n=385).

<i>CYP3A5</i> -genotyper	Antall	Median 4 β -OH-K-konsentrasjon i nmol/L (spredning)	Andel	95 % KI
<i>CYP3A5</i> *1/*1	8	59.0 (27.6, 154.8)	0.021	(0.01-0.041)
<i>CYP3A5</i> *1/*3	70	62.8 (20, 310.8)	0.182	(0.146-0.224)
<i>CYP3A5</i> *3/*3	307	52,2 (13.1, 472.2)	0.797	(0.754-0.835)

Tabell 3.5 Frekvensandel av ulike *CYP3A4*-genotyper med tilhørende KI og median 4 β -OH-K-konsentrasjon i de ulike genotypene (n=385).

<i>CYP3A4</i> -genotyper	Antall	Median 4 β -OH-K-konsentrasjon i nmol/L (spredning)	Andel	95 % KI
<i>CYP3A4</i> *1/*22	28	43.4 (14.1, 121.9)	0.073	(0.051-0.103)
<i>CYP3A4</i> *1/*1	357	57.8 (13.1, 472.2)	0.927	(0.897-0.950)

Tabell 3.6 Frekvensandel av ulike *POR*-genotyper med tilhørende KI og median 4 β -OH-K-konsentrasjon i de ulike genotypene (n=385).

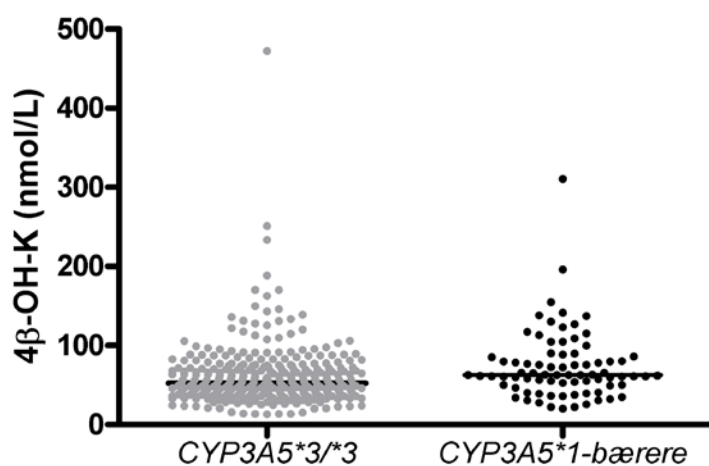
<i>POR</i> -genotype	Antall	Median 4 β -OH-K-konsentrasjon i nmol/L (spredning)	Andel	95 % KI
<i>POR</i> *1/*1	168	52.2 (13.1, 145.9)	0.436	(0.388-0.486)
<i>POR</i> *1/*28	181	57.4 (13.4, 472.2)	0.470	(0.421-0.520)
<i>POR</i> *28/*28	36	68.9 (15.7, 310.8)	0.094	(0.068-0.127)

3.3 Betydning av genotypen til *CYP2D6* og *CYP2C19* for 4 β -OH-K- konsentrasjon

Det ble ikke sett statistisk signifikant forskjell i 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom de ulike *CYP2D6*-genotypene, det er kun små forskjeller i mediannivå mellom gruppene. Ved *CYP2C19* er det en økning på omtrent 17 % fra EM til PM (median 53 vs. 63.7 nmol/L), men dette ga ingen statistisk signifikant forskjell ($p=0.5026$).

3.4 Betydning av *CYP3A5*-genotype for 4 β -OH-K-konsentrasjon

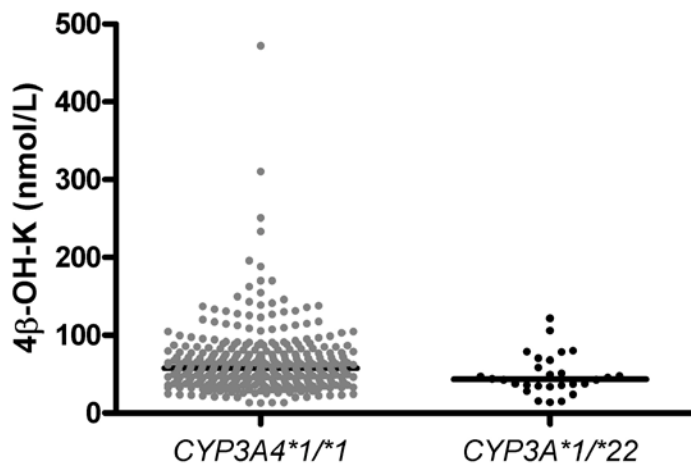
Det ble sett en signifikant økning i 4 β -OH-K-konsentrasjonen mellom bærere av *CYP3A5**3/*3 og bærere av *CYP3A5**1 (både heterozygote og homozygote), hhv. omtrent 17 % høyere 4 β -OH-K-konsentrasjon hos *CYP3A5**1-bærere ($p=0.0040$, figur 3.2). Videre ble en økning på ca. 11 % mellom *CYP3A5**1/*1 og *CYP3A5**3/*3 sett, men forskjellen var ikke signifikant ($p=0.7816$). Forskjellen mellom *CYP3A5**1/*3 og *CYP3A5**3/*3 utgjorde også ca. 17 %, og var signifikant ($p= 0.0028$).



Figur 3.2 Spredningen i 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) konsentrasjoner mellom *3/*3 ($n=307$) og *1-bærere ($n=78$). Linjene marker median, hhv. 52.2 nmol/L og 62.8 nmol/L ($p=0.004$).

3.5 Betydning av *CYP3A4*-genotype for 4β-OH-K-konsentrasjon

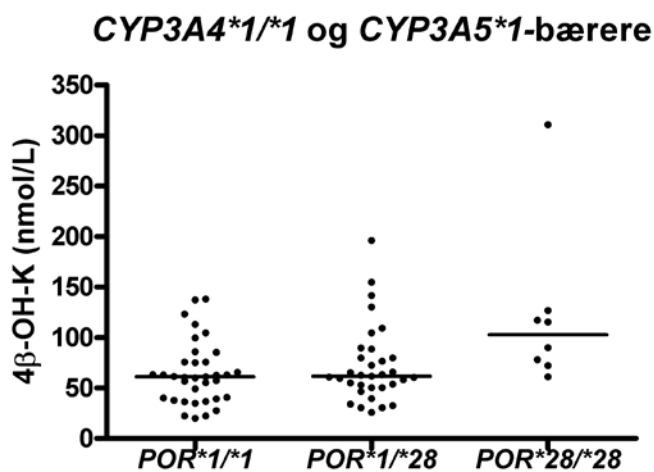
Bærere av ett *CYP3A4**22-allel viste en signifikant nedgang på 25 %, i 4β-OH-K-konsentrasjon sammenlignet med bærere av *CYP3A4**1/*1 ($p=0.0145$, figur 3.3).



Figur 3.3 Spredningen i 4β-hydroksykolesterol (4β-OH-K) konsentrasjoner mellom *CYP3A4**1/*1 ($n=357$) og *CYP3A4**1/*22 ($n=28$). Linjene markerer median, hhv. 57.8 og 43.4 nmol/L ($p=0.0145$).

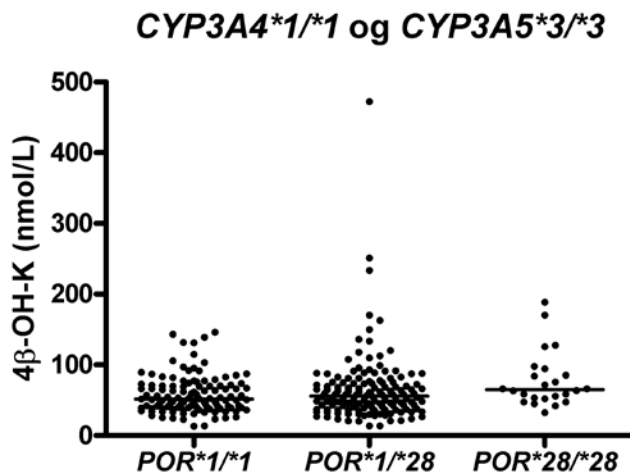
3.6 Betydning av genotipekombinasjoner for 4β-OH-K-konsentrasjon

Spredningen i 4β-OH-K konsentrasjonene mellom de forskjellige tidligere definerte genotipekombinasjonene er presentert i figur 3.6-3.9.



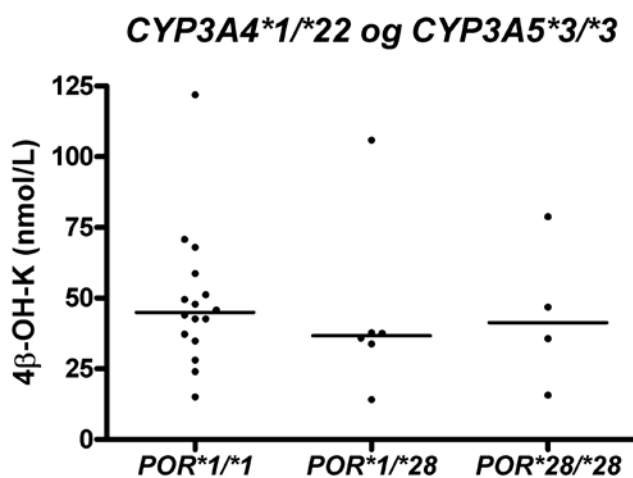
Figur 3.6 Spredning i 4β-hydroksykolesterol (4β-OH-K) konsentrasjoner mellom *POR**1/*1 ($n=35$), *POR**1/*28 ($n=33$) og *POR**28/*28 ($n=8$). Linjene markerer median, hhv. 61.1, 61.7 og 102.7 nmol/L

Analysen av individer klassifisert som *CYP3A4*1/*1* og *CYP3A5*1*-bærer viste at enkelte av undergruppene (*POR*1/*1*, *POR*1/*28* og *POR*28/*28*) utviste signifikant forskjell i serumkonsentrasjon av 4β-OH-K. Både mellom undergruppene *POR*1/*28* og *POR*28/*28* ($p=0.0143$), og mellom *POR*1/*1* og *POR*28/*28* ($p=0.0058$) var det signifikant forskjell, med en økning på økningen omtrent 40 % for *POR*28/*28*-bærere i begge undergruppene. Det var ingen forskjell mellom undergruppene *POR*1/*28* og *POR*1/*1* ($p=0.4998$)



Figur 3.7 Spredning i 4β-hydroksykoolesterol (4β-OH-K) konsentrasjoner mellom *POR*1/*1* (n=116), *POR*1/*28* (n=141) og *POR*28/*28* (n=24). Linjene markerer median, hhv. 51.6, 55.5 og 64.8 nmol/L

For bærere av både *CYP3A4*1/*1* og *CYP3A5*3/*3* ble det sett signifikant forskjell mellom de som videre var bærere av *POR*28/*28* sammenlignet med *POR*1/*1* ($p=0.0086$), Forskjellen mellom undergrupperingene *POR*28/*28* og *POR*1/*1* utgjorde omtrent 20 % økning fra *POR*1/*1*. Ingen forskjell ble sett når andre kombinasjoner ble undersøkt statistisk i denne gruppen.



Figur 3.8 Spredning i 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) konsentrasjoner mellom *POR*1/*1* (n=16), *POR*1/*28* (n=6) og *POR*28/28* (n=4). Linjene markerer median, hhv. 44.9, 36.8, og 41.3 nmol/L

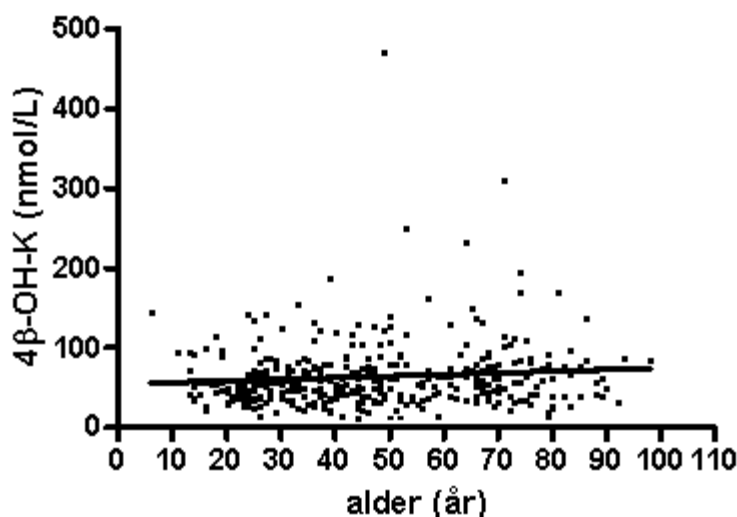
Det ble ikke sett noen statistisk forskjell mellom bærere av *CYP3A4*1/*22* og *CYP3A5*3/*3* innad mellom de ulike undergrupperingene *POR*1/*1*, *POR*1/*28* og *POR*28/28*.

I gruppen som var bærere av *CYP3A4*1/*22* og *CYP3A5*1*-bærere og videre enten *POR*1/*1* (n=1), *POR*1/*28* (n=1) og *POR*28/28* (n=0) var det ikke mulig med statistiske tester da få i studiegruppen hadde disse genotypekombinasjonene. Serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K var hhv. 78.5 og 80.4 nmol/L.

Totalt 160 personer (40 %) hadde serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K <50nmol/L, en grenseverdi som på forhånd ble foreslått som mulig «cut-off» for nedsatt CYP3A-fenotype. Andelen bærere av genotypekombinasjonen *CYP3A4*1/*22* + *CYP3A5*3/*3* var 0.73 ved 4 β -OH-K <50nmol/L sammenlignet med 0.27 >50nmol/L (odds ratio 4.158, 95% KI 1.70-10.15, p=0.0015).

3.7 Betydning av alder

Sammenheng mellom alder og serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K er vist i figur 3.9 (p=0.0879, Spearman`s *r* 0.08609).



Figur 3.9 Korrelasjon mellom alder og konsentrasjonen av 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K). Lineær trendlinje er lagt til for å visualisere sammenhengen.

4 Diskusjon

Denne studien er den første som har undersøkt assosiasjonen mellom serumkonsentrasjonen av den endogene biomarkøren 4β-OH-K og ulike genotyper av *CYP3A4*, *CYP3A5* og *POR*. Funnene indikerer at 4β-OH-K blir påvirket av genetisk variasjon i både *CYP3A4*, *CYP3A5* og *POR*, og spesielle genotypekombinasjoner kan ha innvirkning på CYP3A-fenotype. Videre tyder denne studien på at effekten av genvarianten *POR**28 spriker mye avhengig av den enkeltes persons *CYP3A4/5*-genotype.

Et av målene med denne studien var å undersøke betydningen av *CYP3A4**1/*22 for serumkonsentrasjonen av 4β-OH-K. Tidligere studier har rapportert at *CYP3A4**22 medfører nedsatt CYP3A4-aktivitet for en rekke substrater, som fører til redusert dosebehov (41, 44-46). Resultatene av vår studie viser en 25 % reduksjon i median 4β-OH-K konsentrasjon hos bærere av *CYP3A4**1/*22 sammenlignet med *CYP3A4**1/*1. Effektstørrelsen på 25 % nedgang i fenotype ser ikke ut til å samsvare med det som har vært observert for dosereduksjonen til CYP3A4-substrater (49). Dosereduksjonen ser ut til å variere mellom ulike studier. Det er blant annet rapportert et estimat på halvering i dose av ciklosporin for å oppnå terapeutisk vindu for bærere av ett eller to *CYP3A4**22-allel (49). En annen studie har vist at *CYP3A4**22 allelet er assosiert med nedsatt CYP3A4-proteinuttrykk i lever, og senkning i CYP3A4-mediert enzymaktivitet (41). Derfor kan det tyde på at *CYP3A4**1/*22 forårsaker nedsatt CYP3A4-fenotype uavhengig av substrat-type, men det kan likevel antas at *CYP3A4**1/*22 påvirker substratene i ulik grad. Denne mutasjonen vil ha mindre betydning i en stor populasjon på grunn av den lave frekvensen i befolkning, men for enkeltindividet med denne mutasjonen vil det ha konsekvenser. *CYP3A4**1/*22 kan bidra til den inter-individuelle variasjonen i 4β-OH-K-konsentrasjon. Allelfrekvensen i denne studien var 7,3 % (95 % KI 0.051-0.103) som samsvarer med tidligere rapporterte tall (39, 41).

I tråd med en tidligere studie (58) ble det observert at serumkonsentrasjonen av 4β-OH-K var signifikant høyere hos bærere av *CYP3A5**1, i sammenlignet med *CYP3A5**3/*3-genotype, anslagsvis 15-20 % høyere median konsentrasjon. Resultatet om nedsatt CYP3A5-fenotype for bærere av *CYP3A5**3/*3-genotype støtter dermed studier som tidligere har rapportert dosereduksjon av legemidler metabolisert av CYP3A5 hos personer uten funksjonell CYP3A5 (*3/*3-genotype), sammenlignet med *CYP3A5**1-bærere (33, 37). Det var litt

overraskende at personer med homozygot *CYP3A5*1*-genotype (n=8) ikke hadde høyere nivåer av 4β-OH-K sammenlignet med heterozygote *CYP3A5*1*-bærere (n=70). En tidligere studie på en japansk studiegruppe utført av Suzuki *et al.* rapporterte statistisk forskjell i serumkonsentrasjon av 4β-OH-K mellom alle tre genotypene i *CYP3A5* (**1/*1*, **1/*3* og **3/*3*), med prosentvis fordeling av individer i genotype-gruppene hhv. 11, 33 og 56 % (58). Mulig forklaring på manglende statistiske funn i vår studie kan være den lave frekvensen av *CYP3A5*1/*1*-bærere i den kaukasiske befolkningen, som studiegruppen antageligvis hovedsakelig består av. Vår studiegruppe besto av kun 2 % bærer av *CYP3A5*1/*1*, som samstemmer med tidligere rapporterte tall (37). *CYP3A5* polymorfismer kan representere en liten del av den inter-individuelle variasjonen i serumkonsentrasjonen til 4β-OH-K og videre *CYP3A*-aktivitet.

*POR*28* har i tidligere studier vist motstridende resultater med hensyn til påvirkning på *CYP3A*-fenotype. Mens enkelte studier har rapportert høyere aktivitet hos bærere av *POR*28* (33, 49, 53), har andre studier observert det motsatte (43). Dette kan indikere at genetisk variasjon i *POR* er avhengig av *CYP3A*-substrat, men forskjellen kan også være knyttet til *CYP3A4/5*-genotype. Et av målene med denne studien var som følge av få studier på emnet, å undersøke betydningen av *POR*-genotype i ulike genotyekombinasjoner av *CYP3A4* og *CYP3A5* for serumkonsentrasjonen av 4β-OH-K som biomarkør for *CYP3A4/5*. Etter vårt bekjentskap har dette ikke tidligere blitt utført.

Ved sammenligning av de to genotyekombinasjonene hvor det forventes størst forskjell i median serumkonsentrasjon av 4β-OH-K, grunnet forskjellig aktivitet i genotypene, ble det observert en betydelig differanse. Det er mer enn en dobling i median serumkonsentrasjon fra den «første» til «andre» gruppen av genotyekombinasjonene; *CYP3A4*1/*22*, *CYP3A5*3/*3*, *POR*1/*1* og *CYP3A4*1/*1*, *CYP3A5*1*-bærere og *POR*28/*28*. Fremstilling av dette resultatet viser at individer i hver av de to overnevnte genotyekombinasjonene vil kunne ha en betydelig forskjell i *CYP3A*-aktivitet. Dette igjen vil kunne være med å forklare noe av den inter-individuelle variasjonen i 4β-OH-K-konsentrasjon, og variabilitet i legemiddelmetabolisme når legemidlet er substrat for *CYP3A*.

Et spørsmål som kan stilles er hvorvidt man kan kategorisere gruppen med genotyekombinasjonen *CYP3A4*1/*22* + *CYP3A5*3/*3* for *CYP3A* «poor metabolizers» (PMs). Andelen med denne genotypen utgjorde totalt 6,5 % av hele studiepopulasjonen. «Cut-

off»-verdien vår for tenkt nedsatt CYP3A-aktivitet ble på forhånd definert som 4β-OH-K-konsentrasjon <50 nmol/L, basert på studier som viser at nivå av 4β-OH-K hos friske voksne vanligvis befinner seg i intervallet 50-125 nmol/L (34, 70). I ettertid kan det diskuteres om denne grenseverdien var passende, ettersom 40 % av de målte prøvene viste seg å være under 50 nmol/L. Uansett var den en signifikant overhyppighet av pasienter med genotypekombinasjonen *CYP3A4*1/*22* + *CYP3A5*3/*3* blant de med 4β-OH-K <50 nmol/L. En om lag firedobbel hyppighet av pasienter med denne genotypekombinasjonen ved målt nivå av 4β-OH-K <50 nmol/L indikerer at dette kan være en interessant gruppe å identifisere i klinisk praksis, men flere studier er nødvendig for å evaluere i hvilken grad *CYP3A4/5*-genotyping kan være nyttig som verktøy for individuell dosetilpassing av CYP3A-substrater. Ettersom andre forhold enn farmakogenetikk er minst like viktige for variasjon i CYP3A-fenotype, kan muligens direkte måling av biomarkør – eksempelvis 4β-OH-K – ha større praktisk nytteverdi enn genotyping som verktøy for dosetilpassing av CYP3A-substrater.

Resultatene fra denne masteroppgaven kan tyde på at effekten av variantallelet *POR*28* uteblir i tilfeller der individet er bærer av *CYP3A4*1/*22*. For gruppen tidligere definert som CYP3A PMs var ikke *POR*28* assosiert med forskjell i serumkonsentrasjon av 4β-OH-K. Dette indikerer at et visst fenotypenivå av *CYP3A4/5* må være tilstede for at *POR*28* skal ha påvirkningsevne på CYP3A-aktivitet. Få individer i studien var bærere av *CYP3A5*1* og samtidig *CYP3A4*22*-bærere (n=2), og det var ikke mulig å studere *POR*-genotyper sin påvirkningseffekt i denne genotypekombinasjonen. Det er dermed uvisst hvordan *POR*-genotype påvirker 4β-OH-K når et individ har funksjonell CYP3A5, og ikke-funksjonell CYP3A4. Det kunne vært interessant å følge videre, da flere studier har hentydet at *POR* ikke påvirker CYP3A4, men kun CYP3A5, forutsatt at denne er funksjonell (43). Samtidig vil denne undergruppen være såpass liten at en eventuell effekt av *POR*28* vil være av svært begrenset klinisk betydning.

En annen viktig observasjon angående genotypekombinasjoner av *CYP3A4/5* og *POR*, er at *POR*28/*28* har sterkest betydning for serumkonsentrasjonen av 4β-OH-K i tilfeller hvor individet i tillegg er bærer av *CYP3A4*1/*1* og *CYP3A5*1*-bærer. Denne studiepopulasjonen har høyere median serumkonsentrasjon av 4β-OH-K enn de andre genotypekombinasjonene. Til sammenligning har bærere av *POR*28/*28* som i tillegg kategoriseres som bærere av *CYP3A4*1/*1* og *CYP3A5*3/*3* i overkant av halvparten av median serumkonsentrasjon til

overnevnt gruppe. Dette tydeliggjør at *POR*28* har størst betydning dersom personen har funksjonell CYP3A5 og CYP3A4. Likevel er det statistisk forskjell mellom gruppene som er bærere av *CYP3A4*1/1*, *CYP3A5*3/3* og enten *POR*28/28* eller *POR*1/1*. Dette underbygger at *POR*28/28* påvirker CYP3A4-aktivitet når CYP3A5 ikke er funksjonell, men i mindre grad enn ved tilstedeværelse av funksjonell CYP3A5. En studie på temaet avdekket at CYP3A4 får økt aktivitet dersom et individ har *POR*28* og ikke-funksjonell CYP3A5 (53).

Det er en beskjeden forskjell i median 4β-OH-K konsentrasjon mellom *POR*1/1* og *POR*1/28* i studiegruppen med *CYP3A4*1/1* + *CYP3A5*1*-bærere. Antall personer i de to gruppene var hhv. 35 og 33, og det kan diskuteres om gruppene er tilstrekkelig store til å se en eventuell forskjell. På den andre siden ble det samme sett for median 4β-OH-K serumkonsentrasjon hos bærere av *CYP3A4*1/1* + *CYP3A5*3/3*, mellom undergruppene *POR*1/1* og *POR*1/28* med n= 116 og n=141, som er en vesentlig større studiepopulasjon. Dette underbygger at *POR*28/28* gir større variasjon i 4β-OH-K sammenlignet med *POR*1/28* og *POR*1/1*.

I overensstemmelse med tidligere studier er det sett at induksjon av CYP3A4/5, i vårt tilfelle karbamazepin, øker 4β-OH-K serumkonsentrasjonen (63, 67). Det ble observert en 8 ganger høyere median serumkonsentrasjon av 4β-OH-K i pasienter komedisinert med karbamazepin sammenlignet med resten av studiegruppen. Dette gir sterk støtte til 4β-OH-K som biomarkør for å fange opp CYP3A-induksjon. Bruk av den sterke induseren karbamazepin ser ut til å overstyre effekten av genotyper, da 4β-OH-K stiger kraftig ved bruk av karbamazepin. Studien inkluderte ingen individer bekreftet komedisinert med en hemmere av CYP3A4/5, og er derfor ikke undersøkt.

Det ble i vår studie observert at kvinner hadde omkring 20 % høyere median serumkonsentrasjon av 4β-OH-K sammenlignet med menn. Tilsvarende har en tidligere studie rapportert om signifikant økt nivå av 4β-OH-K hos kvinner sammenlignet med menn (34). En noe økt CYP3A-aktivitet hos kvinner versus menn, som lenge har blitt foreslått basert på observerte kjønnsforskjeller i farmakokinetikk av CYP3A-substrater (21), virker derfor å være «sann» ut ifra våre og andre resultater. Grunnen til kjønnsforskjellen i CYP3A-aktivitet skyldes trolig hormonell regulering av CYP3A-enzymuttrykk (20).

Det ble ikke sett noen signifikant sammenheng mellom serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K og alder, men p-verdien er relativt lav, og det tyder på at det kan være en assosiasjon, men likevel ser ikke alder ut til å være et element av stor betydning for variabiliteten til 4 β -OH-K.

Det har vært en tenkt hypotese at i tilfeller der et individ har nedsatt CYP2D6 og CYP2C19-aktivitet vil andre enzymer eksempelvis CYP3A4/5 får oppregulert aktivitet. I undersøkelser på betydningen av CYP2D6 og CYP2C19 i assosiasjon til 4 β -OH-K ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom de ulike genotypegruppene. Av den grunn ble ingen sammenheng sett mellom disse to CYP-enzymene og nivået av 4 β -OH-K i serum.

21 av prøvene hadde konsentrasjoner under LLOQ, og disse konsentrasjonene må ilegges noe usikkerhet, men ble tatt med i beregningene. Dette er uheldig, men på tross av usikkerhet rundt nøyaktig konsentrasjon er dette kun en liten andel av hele studiepopulasjonen. Det kan tenkes at endringer i disse lave konsentrasjonene vil ha mindre betydning for resultatet.

Flere metoder for fenotyping av CYP3A-aktivitet har blitt foreslått. Den mest utbredte og aksepterte biomarkøren for CYP3A-aktivitet er de eksogene biomarkørene midazolam og erytromycin (56). Ingen kjente endogene biomarkører benyttes til nå i praksis.

Serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K, som benyttes for å evaluere CYP3A-aktivitet i denne studien, er etter hvert en godt studert CYP3A-biomarkør. En liten andel av kroppens kolesterol blir omdannet til 4 β -OH-K via CYP3A4/5 (34, 63), og en rekke studier tyder nå på at den er en egnet biomarkør (34, 55, 67, 71). 4 β -OH-K har imidlertid lang halveringstid (17 dager) (55), noe som medfører at følsomheten til å fange opp raske endringer i fenotype, som for eksempel oppstart med CYP3A-hemmer, er dårlig. I et mer langsiktig perspektiv, og ved eventuell kombinasjonsbruk av CYP3A-indusere, virker derimot 4 β -OH-K som en gunstig biomarkør- ikke minst på grunn av dens endogene natur. I klinisk praktisk sammenheng har 4 β -OH-K et potensiale både som markør for individuell dosetilpasning og mulig CYP3A-påvirkning av pågående legemiddelbehandling.

I denne studien er det utført genotyping, og da er det viktig å notere seg at **1* ikke nødvendigvis betyr at ingen mutasjon er tilstedeværende. Med **1* menes fravær av andre målte mutasjonene. Personer klassifisert som **1* kan således være bærer av en sjelden mutasjon med et annet aktivitetsbilde enn **1*.

Studien ble basert på biobankede prøver, og er derfor utført på reelle personer som behandles i helsevesenet, og er ikke basert på friske frivillige. Dermed blir data fra pasienter som ellers blir ekskludert fra kliniske studier tatt med. Friske frivillige forsøkspersoner kan tenkes å skille seg fra denne pasientgruppen sosiodemografisk (for eksempel legemiddelbruk, livsstil, og røkevaner) og fysiologisk. Det kan derfor diskuteres om studien i større grad reflekterer den faktiske virkeligheten enn bruk av friske frivillige personer. Da det er biobankede prøver, vil ikke personer utsettes for ekstra belastning på grunn av inkludering i studien. Data om inkluderte personer baseres på rekvisisjoner fra leger. Dette er en potensiell feilkilde, på grunn av den varierende utfyllingsgraden og nøyaktigheten til de forskjellige legene. Fullstendig bilde over legemiddelbruk, (bruk av indukere/hemmere) og eventuelt relevante interaksjoner vil ikke være mulig. I en slik studie vil vi heller ikke ha kontroll på eventuell komorbid sykdom som kan påvirke CYP3A som videre kan gi utslag i 4β-OH-K-nivå. Det kan tenkes at det store datamaterialet i studien kan kompensere for slike eventuelle enkeltobservasjoner.

5 Konklusjon

Denne studien viser at *CYP3A4/5*- og *POR*-genotyper har signifikant betydning for individuell variasjon i *CYP3A*-fenotype, målt som nivå av 4 β -OH-K. Fordelingene av median 4 β -OH-K serumkonsentrasjonene får støtte av forventet enzymaktivitet i forhold til tidligere studier på de enkelte genotypene, hhv. *POR*, *CYP3A4* og *CYP3A5*. *CYP3A5**3/*3 og *CYP3A4**1/*22 gir begge signifikant nedsatte serumnivå av 4 β -OH-K sammenlignet med *CYP3A5**1/*1 og *CYP3A4**1/*1.

Personer med ikke-funksjonell *CYP3A5*-genotype i kombinasjon med *CYP3A4**22 kan tenkes å representere en gruppe med generelt nedsatt *CYP3A*-fenotype, men effekten på farmakokinetisk variasjon kan variere mellom ulike *CYP3A*-substrater.

Videre tyder studien på at effekten av genvarianten *POR**28 varierer mye avhengig av den enkelte persons *CYP3A4/5*-genotype, og mister trolig påvirkningsevne ved nedsatt *CYP3A4*-metabolisme. *POR**28/*28 ser ut til å ha sterkest påvirkning for økning av 4 β -OH-K serumnivå ved tilstedeværelse av funksjonell *CYP3A4* og *CYP3A5*.

POR- og *CYP3A4/5*-genotyper er kilder til variasjon i nivå av 4 β -OH-K, men andre faktorer, som eksempelvis bruk av *CYP3A*-indusere, er kvantitativt viktigere for individuelle forskjeller i serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K.

Litteraturliste

1. Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *The Annals of pharmacotherapy*. 2008;42(7):1017-25.
2. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama*. 1998;279(15):1200-5.
3. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *Journal of internal medicine*. 2001;250(3):186-200.
4. Rowland M, Tozer T. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 4th ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011. p. 4-10.
5. Hendset M, Hermann M. [Why measure drug metabolites?]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2007;127(13):1786-8.
6. Johannessen SI, Landmark CJ. Value of therapeutic drug monitoring in epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*. 2008;8(6):929-39.
7. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, et al. Antiepileptic drugs--best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2008;49(7):1239-76.
8. Grundmann M, Kacirova I, Urinovska R. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*. 2014;64(4):387-401.
9. Andersen S, Refsum H, Tanum L. [Use of psychopharmaceuticals--should serum concentration be checked?]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2004;124(18):2362-4.
10. Vesell ES. Advances in pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Journal of clinical pharmacology*. 2000;40(9):930-8.
11. Gonzalez J, Tukey RH. Drug metabolism. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS*. 7 ed. USA: The McGraw-Hill Companies 2006. p. 71-8.
12. Rowland M, Tozer T. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 4 ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins, a Wolter Kluwers business; 2011. p. 357-63.
13. Spigset O, Slordal L. [Basic pharmacokinetics--elimination]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2005;125(9):1181-2.
14. Spigset O. Cytokrom P-450-systemet. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2001;121(28):3296-8.
15. Bozina N, Bradamante V, Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2009;60(2):217-42.
16. Rudberg I, Solberg DK, Refsum H. [CYP genotyping in psychopharmacological treatment]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2005;125(21):2953-5.
17. Ma JD, Nafziger AN, Bertino JS, Jr. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and the effect on interindividual, pharmacokinetic variability in extensive metabolizers. *Journal of clinical pharmacology*. 2004;44(5):447-56.
18. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Frontiers in genetics*. 2013;4:12.

19. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolter Kluwers business; 2011. p. 339-45.
20. Thangavel C, Boopathi E, Shapiro BH. Inherent sex-dependent regulation of human hepatic CYP3A5. *British journal of pharmacology*. 2013;168(4):988-1000.
21. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, et al. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003;38(4):978-88.
22. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2011. p. 112-5.
23. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *Jama*. 2001;286(18):2270-9.
24. Klein K, Thomas M, Winter S, Nussler AK, Niemi M, Schwab M, et al. PPARA: a novel genetic determinant of CYP3A4 in vitro and in vivo. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;91(6):1044-52.
25. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):880-6.
26. Kwadijk-de Gijzel S, Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Vulto AG, et al. Variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower serum sodium concentration in patients on antidepressants. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;68(2):221-5.
27. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*. 2002;3(2):229-43.
28. Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Moraes SM, Bell D, Krahn PM, et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics*. 1997;7(1):59-64.
29. Ramsjo M, Aklillu E, Bohman L, Ingelman-Sundberg M, Roh HK, Bertilsson L. CYP2C19 activity comparison between Swedes and Koreans: effect of genotype, sex, oral contraceptive use, and smoking. *European journal of clinical pharmacology*. 2010;66(9):871-7.
30. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;79(1):103-13.
31. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(8):883-91.
32. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54(10):1271-94.
33. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(9):1281-91.
34. Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, et al. 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5

- genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(3):201-8.
35. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical pharmacokinetics*. 2006;45(1):13-31.
 36. Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Molecular pharmacology*. 2002;62(1):162-72.
 37. Lesche D, Sigurdardottir V, Setoud R, Oberhansli M, Carrel T, Fiedler GM, et al. CYP3A5*3 and POR*28 Genetic Variants Influence the Required Dose of Tacrolimus in Heart Transplant Recipients. *Therapeutic drug monitoring*. 2014;36(6):710-5.
 38. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Boso V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *The pharmacogenomics journal*. 2014.
 39. de Jonge H, Elens L, de Loor H, van Schaik RH, Kuypers DR. The CYP3A4*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(2):144-52.
 40. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine*. 2005;352(21):2211-21.
 41. Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H. CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *The Journal of toxicological sciences*. 2013;38(3):349-54.
 42. Bruckmueller H, Werk AN, Renders L, Feldkamp T, Tepel M, Borst C, et al. Which genetic determinants should be considered for tacrolimus dose optimization in kidney transplantation? A combined analysis of genes affecting the CYP3A locus. *Therapeutic drug monitoring*. 2014.
 43. Elens L, Nieuweboer AJ, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, et al. Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(3):148-55.
 44. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(4):274-86.
 45. Elens L, Becker ML, Haufroid V, Hofman A, Visser LE, Uitterlinden AG, et al. Novel CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(12):861-6.
 46. van der Weide K, van der Weide J. The influence of the CYP3A4*22 polymorphism on serum concentration of quetiapine in psychiatric patients. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2014;34(2):256-60.
 47. Ozdemir V, Kalow W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*. 2000;10(5):373-88.
 48. Rahmioglu N, Heaton J, Clement G, Gill R, Surdulescu G, Zlobecka K, et al. Genetic epidemiology of induced CYP3A4 activity. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(10):642-51.
 49. Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, Bergan S, et al. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and

- cyclosporine in renal transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(6):685-93.
50. Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(8):6536-41.
 51. Pandey AV, Sproll P. Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:103.
 52. Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(5):1733-8.
 53. Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M, et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients. *Therapeutic drug monitoring*. 2014;36(1):71-9.
 54. Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL. Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(10):611-8.
 55. Diczfalusy U, Kanebratt KP, Bredberg E, Andersson TB, Bottiger Y, Bertilsson L. 4beta-hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;67(1):38-43.
 56. Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):187-216.
 57. Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Therapeutic drug monitoring*. 2013;35(5):608-16.
 58. Suzuki Y, Itoh H, Fujioka T, Sato F, Kawasaki K, Sato Y, et al. Association of plasma concentration of 4beta-hydroxycholesterol with CYP3A5 polymorphism and plasma concentration of indoxyl sulfate in stable kidney transplant recipients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(1):105-10.
 59. Bjorkhem-Bergman L, Backstrom T, Nylen H, Ronquist-Nii Y, Bredberg E, Andersson TB, et al. Comparison of endogenous 4beta-hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction by rifampicin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(8):1488-93.
 60. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1994;271(1):549-56.
 61. Hohmann N, Kocheise F, Carls A, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. Midazolam microdose to determine systemic and pre-systemic metabolic CYP3A activity in humans. *British journal of clinical pharmacology*. 2014:n/a-n/a.
 62. Mirghani RA, Ericsson O, Tybring G, Gustafsson LL, Bertilsson L. Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man. *European journal of clinical pharmacology*. 2003;59(1):23-8.
 63. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broome U, Einarsson C, et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans:

- evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38685-9.
64. Furuta T, Suzuki A, Mori C, Shibasaki H, Yokokawa A, Kasuya Y. Evidence for the validity of cortisol 6 beta-hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003;31(11):1283-7.
 65. Galteau MM, Shamsa F. Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *European journal of clinical pharmacology*. 2003;59(10):713-33.
 66. Suzuki Y, Itoh H, Sato F, Kawasaki K, Sato Y, Fujioka T, et al. Significant increase in plasma 4beta-hydroxycholesterol concentration in patients after kidney transplantation. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2568-72.
 67. Diczfalusy U, Nylen H, Elander P, Bertilsson L. 4beta-Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(2):183-9.
 68. Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, et al. Metabolism of 4 beta -hydroxycholesterol in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):31534-40.
 69. Leil TA, Kasichayanula S, Boulton DW, LaCreta F. Evaluation of 4beta-Hydroxycholesterol as a Clinical Biomarker of CYP3A4 Drug Interactions Using a Bayesian Mechanism-Based Pharmacometric Model. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*. 2014;3:e120.
 70. van de Merbel NC, Bronsema KJ, van Hout MW, Nilsson R, Sillen H. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4beta-hydroxycholesterol in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;55(5):1089-95.
 71. Dutreix C, Lorenzo S, Wang Y. Comparison of two endogenous biomarkers of CYP3A4 activity in a drug-drug interaction study between midostaurin and rifampicin. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(8):915-20.
 72. Flockhart DA. Drug Interaction: Cytochrome P450 Drug Interaction Table Indiana University School of Medicine 2007 [Lest: 18.08.2014]. Available from: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table/>.
 73. Huynh DK. Utvikling av analysemetode for måling av 4 β -hydroksykolesterol og undersøkelse av 4 β -hydroksykolesterol som biomarkør for CYP3A4-fenotype i kliniske materialer. Oslo: Universitetet i Oslo; 2014.

