

# Biomolekylære markører som kan bidra til individualisert immundempende behandling hos nyretransplanterte

Masteroppgave i farmakologi  
Kristine Hole



Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo

Avdeling for medisinsk biokjemi og  
Avdeling for farmakologi  
Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

15. mai 2013

Masteroppgave i farmakologi for graden Master i farmasi

# Biomolekylære markører som kan bidra til individualisert immundempende behandling hos nyretransplanterte

Kristine Hole

Oppgaven er utført ved:

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

og

Avdeling for medisinsk biokjemi og

Avdeling for farmakologi

Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

**Veiledere:**

**Nils Tore Vethe**, Avd. for farmakologi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

**Stein Bergan**, Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt UiO og

Avd. for farmakologi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

# FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved Avd. for medisinsk biokjemi og Avd. for farmakologi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet, i perioden fra august 2012 til mai 2013.

Hovedveileder var Nils Tore Vethe, og Stein Bergan var internveileder.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Nils Tore, for god oppfølging og veiledning gjennom hele masteroppgaven. Du stiller alltid opp, og svarer på alle mulige spørsmål. Takk for tålmodig hjelp under laboratorieprosessen, og for verdifulle innspill og tilbakemeldinger ved skriving av oppgaven.

Videre vil jeg takke Stein for faglige innspill underveis, og for inspirasjon gjennom mange varierte kollokvier. Takk for all praktisk hjelp med koordinering av prøvetaking til studien.

Takk til Sara for all støtte og hjelp, og til Elisabet for mange gode samtaler og hyggelig fellesskap på laben.

Jeg vil i tillegg takke bioingeniørene på FARM, både for hjelp med blodprøvetaking og analyser dette året, men spesielt for det gode sosiale miljøet. Dere er en fantastisk gjeng som har tatt godt i mot oss studenter, og jeg setter pris på alle de trivelige kaffi- og lunsjpausene.

Til slutt vil jeg takke Pål-Dag Line og Morten Skauby ved Transplantasjonskirurgisk seksjon for hjelp med prøveanskaffelse til studien, og takk til de fem frivillige som stilte opp med blodprøver til studien.

Jeg vil minnes tiden på Rikshospitalet som spennende, lærerik og morsom. Dette har vært et flott år både faglig og sosialt, og jeg er takknemlig for alle erfaringer jeg har fått med meg.

Kristine Hole

Oslo, mai 2013

# INNHOOLD

FORORD .....	3
FORKORTELSER .....	7
SAMMENDRAG .....	10
1 INNLEDNING .....	12
1.1 Organtransplantasjon.....	12
1.1.1 Nyretransplantasjon.....	12
1.1.2 Vevsforlikelighet.....	13
1.1.3 Avstøtningsreaksjoner .....	14
1.2 Immundempende behandling.....	15
1.2.1 Glukokortikoider.....	16
1.2.2 Kalsineurinhemmere .....	17
1.2.3 IMPDH-hemmeren mykofenolat .....	18
1.2.4 mTOR-hemmere .....	19
1.3 Terapeutisk legemiddelmonitorering .....	20
1.3.1 Farmakokinetisk monitorering hos nyretransplanterte.....	21
1.3.2 Farmakodynamisk monitorering som ny strategi .....	22
1.4 Biomolekylære markører.....	22
1.4.1 Metabolsk aktivitet relatert til mitokondrielle dehydrogenaser.....	23
1.4.2 IMPDH-aktivitet .....	25
1.4.3 Purinbaser .....	26
1.4.4 Cytokiner .....	27
1.4.5 <i>Ex vivo</i> -immunaktivering .....	29
2 HENSIKT .....	30
3 MATERIALER .....	31
3.1 Utstyr .....	31
3.2 Reagenser .....	33
4 METODER.....	38
4.1 Studie av biomarkører hos nyretransplanterte.....	38
4.2 Isolering av mononukleære celler i blod.....	39
4.3 Analyse av metabolsk aktivitet.....	40
4.3.1 <i>Ex vivo</i> -stimulering av PBMC .....	40

4.3.2	Metabolsk aktivitet som responsmarkør for immundempende legemidler .....	40
4.3.3	Kvantifisering av metabolsk aktivitet .....	41
4.3.4	Beregninger av aktiveringsgrad og responskurver.....	42
4.4	Analyse av IMPDH-aktivitet og purinbaser .....	43
4.4.1	<i>Ex vivo</i> -stimulering av PBMC .....	43
4.4.2	Kvantifisering av IMPDH-aktivitet og purinbaser.....	43
4.5	Analyse av cytokiner.....	46
4.5.1	<i>Ex vivo</i> -stimulering av fullblod.....	46
4.5.2	Kvantifisering av cytokiner .....	46
4.6	Undersøkelse av biomarkørers legemiddelselektivitet.....	48
4.7	Statistiske analyser .....	49
5	RESULTATER.....	50
5.1	Inklusjon og prøvetaking.....	50
5.1.1	Friske personer.....	50
5.1.2	Nyretransplanterte .....	50
5.2	Kliniske utfall .....	51
5.3	Farmakokinetikk .....	51
5.3.1	Plasmakonsentrasjon av mykofenolat .....	51
5.3.2	Blodkonsentrasjon av takrolimus.....	52
5.4	Metabolsk aktivitet som biomarkør .....	53
5.4.1	Legemiddelrespons målt før transplantasjon.....	53
5.4.2	Aktiveringsgrad målt før og etter transplantasjon.....	57
5.4.3	Aktiveringsgrad i forhold til legemiddelkonsentrasjoner .....	59
5.5	IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører.....	59
5.5.1	Legemiddelselektivitet hos friske .....	59
5.5.2	IMPDH-aktivitet målt før og etter nyretransplantasjon .....	61
5.5.3	Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og mykofenolat hos nyretransplanterte.....	66
5.5.4	Purinbaser målt før og etter nyretransplantasjon .....	66
5.6	Cytokiner som biomarkører.....	73
5.6.1	Legemiddelselektivitet hos friske .....	73
5.6.2	Cytokiner målt før og etter transplantasjon .....	74
5.6.3	Sammenheng mellom cytokiner og takrolimuskonsentrasjon hos nyretransplanterte .....	76

6	DISKUSJON .....	77
6.1	Farmakokinetikk .....	77
6.1.1	Plasmakonsentrasjon av mykofenolat .....	77
6.1.2	Blodkonsentrasjon av takrolimus.....	78
6.2	Metabolsk aktivitet som biomarkør .....	78
6.2.1	Legemiddelrespons målt før transplantasjon.....	78
6.2.2	Aktiveringsgrad målt før og etter transplantasjon.....	80
6.2.3	Aktiveringsgrad i forhold til legemiddelkonsentrasjoner .....	81
6.3	IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører.....	82
6.3.1	Legemiddelselektivitet hos friske .....	82
6.3.2	IMPDH-aktivitet målt før og etter nyretransplantasjon .....	83
6.3.3	Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og mykofenolat hos nyretransplanterte.....	85
6.3.4	Purinbaser målt før og etter nyretransplantasjon .....	85
6.4	Cytokiner som biomarkører.....	86
6.4.1	Legemiddelselektivitet hos friske .....	86
6.4.2	Cytokiner målt før og etter transplantasjon .....	88
6.4.3	Sammenheng mellom cytokiner og takrolimuskonsentrasjon hos nyretransplanterte .....	89
7	KONKLUSJON.....	90
	REFERANSER .....	92
	APPENDIX.....	99

## FORKORTELSER

AcMPAG	Mykofenolat-acylglukuronid
AMP	Adenosin monofosfat
APC	Antigenpresenterende celle
AP-1	Aktivatorprotein-1
ATG	Antihuman thymocyt-kaninimmunoglobulin
AUC	Arealet under konsentrasjon-tidskurven
AUC <sub>0-12t</sub>	Arealet under konsentrasjon-tidskurven 0-12 timer etter inntak av legemiddeldose
BSA	<i>Albumin solution from bovine serum</i>
C <sub>0</sub>	Konsentrasjon rett før inntak av legemiddeldose (ved tid 0)
C <sub>2</sub>	Konsentrasjon to timer etter inntak av legemiddeldose
Ca <sup>2+</sup>	Kalsium
C <sub>maks</sub>	Maksimum konsentrasjon innenfor doseintervall
CMV	Cytomegalovirus
CN	Kalsineurin
CNI	Kalsineurininhibitor
CsA	Ciklosporin A
CYP	Cytokrom P450
DAG	Diacylglycerol
DD	Død donor
dGDP	Deoksyguanosin difosfat
dGTP	Deoksyguanosin trifosfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EC-MPS	Enterodrasjert mykofenolat-natrium ( <i>enteric coated mycophenolate sodium</i> )

EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FKBP-12	FK506-bindende protein 12
GDP	Guanosin difosfat
GK	Glukokortikoider
GM-CSF	Granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor
GMP	Guanosin monofosfat
GTP	Guanosin trifosfat
HLA	Humant leukocytantigen
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IMP	Inosin monofosfat
IMPDH	Inosin monofosfat dehydrogenase
i.v.	Intravenøst
JCV	John Cunningham-virus
LC-MS/MS	Væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri
LD	Levende donor
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPA	Mykofenolsyre ( <i>mycophenolic acid</i> )
MPAG	Mykofenolat-7-O-glukuronid
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
m/z	Masse/ladning
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid (oksidert form)
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (redusert form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NFAT	Nukleær faktor for aktiverte T-celler
NF- $\kappa$ B	Nukleær faktor $\kappa$ B



PBMC	Mononukleære celler i perifert blod ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Fosfatbufret saltvann
PE	Phycoerythrin
P-gp	P-glykoprotein
PHA	Phytohemagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMS	Fenazin metosulfat
p.o.	Peroralt
Post-Tx	Etter transplantasjon
Pre-Tx	Før transplantasjon
PRPP	Fosforibosylpyrofosfat
RNA	Ribonukleinsyre
Rpm	Rotasjoner per minutt
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> (dyrkingsmedium for celler)
SA-PE	Streptavidin-phycoerythrin
$t_{1/2}$	Halveringstid
TCR	T-cellereseptor
TDM	Terapeutisk legemiddelmonitorering ( <i>therapeutic drug monitoring</i> )
$T_H$	T-hjelpecelle
TNF- $\alpha$	Tumor nekrosefaktor $\alpha$
UGT	Uridindifosfat glukuronosyltransferase
VK	Variasjonskoeffisient
WST-1	Vannløselig tetrazoliums salt 1 ( <i>Water soluble tetrazolium salt 1</i> )
XMP	Xantosin monofosfat

## SAMMENDRAG

Etter en allogen nyretransplantasjon er pasientene avhengige av livslang immundempende behandling for å forebygge avstøtning av transplantatet. På grunn av farmakokinetisk variasjon mellom individer er det innført konsentrasjonsmålinger i fullblod eller plasma for å tilpasse doseringen til den enkelte pasient. Nyere forskning viser at det også er stor variasjon i den molekylære responsen mellom individer. Det er derfor potensial til ytterligere individualisering av den immundempende behandlingen ved å måle biomolekylære farmakodynamiske responsmarkører hos pasientene.

Denne oppgaven utgjorde et delprosjekt hvor det ble utført farmakokinetiske og farmakodynamiske undersøkelser hos nyretransplanterte pasienter. Hensikten var å se hvordan responsmarkører i immunceller kan relateres til eksponering og effekt av immundempende legemidler hos nyretransplanterte. Responsmarkørens legemiddelselektivitet skulle i tillegg undersøkes med immunceller fra friske personer. Immuncellers metabolske aktivitet, personers legemiddelsensitivitet, inosin monofosfat dehydrogenase (IMPDH)-aktivitet, nivå av purinbaser og cytokinproduksjon skulle vurderes som potensielle biomarkører.

Det ble tatt blodprøve fra nyretransplanterte pasienter før transplantasjon (pre-Tx) og 6-9 dager, 5-7 uker og 1 år etter transplantasjon (post-Tx). Post-Tx ble prøvene tatt rett før og 1,5 time etter dosering av immundempende legemidler på morgenen. Fullblod og isolerte mononukleære celler i perifert blod (PBMC) ble inkubert i 72 timer med og uten *ex vivo*-stimulering. Metabolsk aktivitet i PBMC ble kvantifisert etter tilsetning av tetrazoliumsaltet WST-1. Legemiddelsensitivitet ble målt hos friske og hos pasienter pre-Tx med metabolsk aktivitet som markør. IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser i PBMC ble kvantifisert ved hjelp av væskrokromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Cytokinproduksjon i stimulert fullblod ble kvantifisert ved hjelp av et multiplex-assay basert på fluorescensmerkede antistoffer.

Metabolsk aktivitet og cytokinproduksjon av interleukin (IL)-6, og IL-17 fremstod som mulige generelle markører for immundempende legemidler. Kalsineurinhemmere hadde den mest fremtredende effekten på IL-2 og tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , og produksjonen av IL-10 ble sterkest hemmet av mTOR- og kalsineurinhemmere. IMPDH-aktivitet, guanin og adenin i stimulerte PBMC fremstod som selektive markører for mykofenolats effekt. I forsøk

hos friske var mykofenolat en 2,6 ganger sterkere hemmer av IMPDH-aktivitet i stimulerede PBMC enn i non-stimulerede. Det bør utføres flere forsøk hvor høyere konsentrasjoner av immundempende legemidler tilsettes PBMC og fullblod fra friske for å bekrefte resultatene.

To av 17 pasienter fikk avstøtning under studieforløpet. Avstøtningene inntraff i løpet av første uke post-Tx. I tillegg ble det påvist subklinisk avstøtning ved biopsi 1 år post-Tx hos en av disse to pasientene. Det ble påvist viremi (polyoma eller cytomegalovirus) hos tre pasienter 5-10 uker post-Tx. Aktiveringsgrad (basert på metabolsk aktivitet), IMPDH-aktivitet, guanin og adenin i stimulerede PBMC kan potensielt både predikere og reflektere avstøtningsepisoder og viremier. Høy relativ cytokinproduksjon ( $t_{1,5}$  i forhold til  $t_0$ ) av IL-2, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$  kan potensielt reflektere pågående avstøtningsepisode. Legemiddelresponskurver ble konstruert for takrolimus, mykofenolat og everolimus i forkant av transplantasjon, men responskurvevariabler viste ingen sammenheng med avstøtning eller viremi i det begrensede datamaterialet. Det er nødvendig med data fra flere pasienter for å trekke konklusjoner om sammenheng mellom biomarkørene og kliniske endepunkter.

Når data fra hele studiepopulasjonen foreligger, bør biomarkørene på nytt korreleres til legemiddeleksponering og klinisk utfall. Potensielle biomarkører bør velges ut og undersøkes nærmere i en større studie av nyretransplanterede, for å demonstrere eventuell klinisk nytteverdi av farmakodynamisk legemiddelmonitorering.

# 1 INNLEDNING

## 1.1 Organtransplantasjon

Å overføre et organ fra én person til en annen var lenge en fjern drøm innen medisinen. Når organtransplantasjon i dag er en veletablert behandlingsform, er det fremdeles fascinerende å se hva forskningen har gjort mulig. Organtransplantasjon er for mange pasienter livreddende, for andre er det en mulighet til å slippe livslang og krevende behandling som for eksempel dialyse.

Verdens første vellykkede organtransplantasjon ble utført i Boston i 1954, og var en nyretransplantasjon mellom eneggede tvillinger. Kun to år etter ble en nyretransplantasjon, hvor nyren kom fra en ubeslektet giver, utført ved Rikshospitalet i Oslo. Til tross for både vevsuforlikelighet og ABO-uforlikelighet levde pasienten i 30 dager med den nye nyren. I begynnelsen visste man lite om årsaken til avstøtningsreaksjoner, og hadde minimalt med immundempende behandling, så organtransplantasjon ble kun utført eksperimentelt når pasienten var døende og ingen andre behandlingsalternativ fantes. I dag er organtransplantasjon foretrukket behandling for en rekke tilstander, blant annet for irreversibel organsvikt (1).

Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet er transplantasjonssenteret i Norge, og all organtransplantasjon utføres her. Organet som oftest transplanteres er nyre, deretter lever og hjerte. Lunger og bukspyttkjertel transplanteres også. I 2011 ble det utført 469 transplantasjoner i Norge, derav 302 nyretransplantasjoner (2).

### 1.1.1 Nyretransplantasjon

Transplantasjon av nyre er den vanligste organtransplantasjonen i Norge, og utføres på pasienter med terminal nyresvikt. Nyresvikt kan forårsakes av flere tilstander, der de vanligste er nefritt, nefrosklerose, diabetes mellitus og cystenyrer. Det finnes kun to alternative behandlingsformer for pasienter med terminal nyresvikt; dialyse og nyretransplantasjon (3). Ved nyretransplantasjon bedres livskvaliteten betraktelig, i tillegg til at det er samfunnsøkonomisk gunstig i forhold til den livslange dialysebehandlingen (4).

I Norge bruker man levende donor (LD) til nyretransplantasjon i de tilfeller hvor det er mulig. Dette gir flere fordeler for pasienten, som ved å slippe å stå på venteliste for nekronyre kan forkorte eller unngå tid i dialyse. I tillegg blir iskemitiden, tiden organet er uten blodtilførsel, kortere (5). For perioden 2000 til 2010 hadde førstegangs nyretransplanterte pasienter i Norge en 5-års graftoverlevelse på 87 % ved LD og 74 % ved død donor (DD). I samme periode var 5-års pasientoverlevelse 93 % ved LD og 80 % ved DD. Fra det norske transplantasjonsprogrammet ble oppstartet i 1969 og frem til 2010 har omtrent 7000 pasienter blitt nyretransplantert, og 40 % av disse har fått nyre fra LD. De siste ti årene har antallet nyretransplantasjoner økt, noe som hovedsakelig skyldes økende donasjon fra døde (6). I 2012 kom 27 % av nyrene fra LD (7).

### 1.1.2 Vevsforlikelighet

Ved genetiske forskjeller mellom donor og mottaker, oppstår immunresponser mot det transplanterte organet. Spesielt forskjeller i MHC-molekyler gir opphav til immunologiske reaksjoner etter transplantasjon (post-Tx). MHC-molekyler er glykoproteiner som kodes av gener i *major histocompatibility complex* (MHC). MHC-molekyler i mennesker kalles humane leukocyttantigen (HLA)-molekyler. HLA-molekylene har en strukturell grop som binder peptider inne i cellene, og komplekser av peptid:HLA-molekyler presenteres så på celleoverflaten. T-cellerreseptorer (TCR) binder til kompleksene, og dersom peptidet er kroppsfremmed aktiveres en immunreaksjon mot celler som bærer kompleksene. Kroppsfremmede peptider kan for eksempel komme fra virus og bakterier, eller fra et transplantat som ikke er genetisk likt mottakeren av transplantatet.

Mennesker uttrykker to typer HLA-molekyler, klasse I og klasse II. HLA klasse I presenterer peptider fra intracellulære proteiner og patogener, for eksempel virus, og fins på alle kjerneholdige celler i kroppen. Peptid:HLA klasse I-komplekset reagerer med cytotoksiske CD8<sup>+</sup> T-celler. HLA klasse II presenterer ekstracellulære peptidantigener som har blitt tatt opp i cellen ved endocytose. Slik presenteres blant annet bakterie- og viruskomponenter fra ekstracellulærmateriale for CD4<sup>+</sup> T-hjelpeceller. HLA klasse II uttrykkes konstitutivt kun på profesjonelle antigenpresenterende celler (APC), som er dendrittceller, makrofager og B-celler (8).

Genetiske varianter av HLA er bakgrunnen for at mennesker har ulike HLA klasse I og II-molekyler, og dette er hovedårsaken til avstøtning av transplanterte organer. HLA-isotypene

som er viktigst å matche før transplantasjon (pre-Tx) er HLA-A, HLA-B (klasse I) og HLA-DR (klasse II), som alle er polymorfe (9). Ulike genetiske varianter av HLA-molekyler kan presentere ulike peptider for T-cellene. Under T-celleutviklingen i thymus vil alle T-celler med høy affinitet for komplekser av HLA og kroppsegne peptider elimineres, slik at immunreaksjoner mot eget vev unngås. Ved transplantasjon gjenkjenner T-cellene kroppsfremmede HLA:peptid-komplekser som de ikke har vært i kontakt med under modning, og immuncellene aktiveres. Donor og mottaker testes for HLA-typer pre-Tx, og høyest mulig grad av forlikelighet tilstrebes for å unngå at immunsystemet ødelegger det transplanterte organet.

Ved syngen transplantasjon, hvor donor og mottaker er genetisk identiske (eneggede tvillinger), er det ikke nødvendig med immundempende behandling da fullstendig vevsforlikelighet forekommer. Nesten alle nyretransplantasjoner er derimot allogene, hvor donor og mottaker er genetisk ulike individer. Man prøver da å finne best mulig vevsforlikelighet mellom donor og mottaker og behandler i tillegg med immundempende legemidler for å hindre avstøtningsreaksjoner post-Tx (8,10).

### **1.1.3 Avstøtningsreaksjoner**

Man kan dele avstøtningsreaksjoner inn i tre grupper, avhengig av hvilke immunologiske mekanismer som er involvert og hvor lenge etter transplantasjonen reaksjonen skjer. Det er hovedsakelig T-celler som medierer avstøtningsreaksjoner, men B-celler spiller en viktig rolle med antistoffproduksjon (11).

#### **Hyperakutt avstøtningsreaksjon**

Hyperakutt avstøtningsreaksjon er den raskest innsettende og mest alvorlige av avstøtningsreaksjonene. Den inntreffer vanligvis innen 48 timer etter transplantasjon, men kan oppstå allerede etter noen minutter. Mekanismen bak reaksjonen er at antistoffer som er spesifikke for ABO-blodtype eller HLA klasse I (og til en viss grad HLA klasse II) på vaskulært endotel i det transplanterte organet, allerede eksisterer i mottakers sirkulasjon pre-Tx. Immunreaksjonen fører til koagulasjon, aktivering av komplementsystemet og kininkaskader. Dette gir intravaskulær trombose, iskemi og påfølgende nekrose i organet (8,12). Antistoffer som reagerer på fremmede HLA-molekyler, kalles alloantistoffer. Pre-eksisterende alloantistoffer kommer vanligvis fra tidligere immuniseringer, som for eksempel

blodoverføringer, graviditet eller tidligere avstøtte transplantater. Hyperakutt avstøtningsreaksjon kan ikke reverseres, og må derfor unngås ved å teste for blodtype- og vevsforlikelighet og for tilstedeværelse av alloantistoffer pre-Tx (10). Ved bruk av levende donor utføres unntaksvis transplantasjon mellom ABO-uforlikelige, da fjernes eksisterende antistoffer fra mottakers sirkulasjon pre-Tx (13).

### **Akutt avstøtningsreaksjon**

Akutt avstøtningsreaksjon inntreffer etter noen dager eller opptil flere måneder etter transplantasjon. Den oppstår ved at mottakers T-celler gjenkjenner HLA-molekyler på donorderiverte APC, og dermed angriper transplantatet, også kalt direkte allogjenkjennelse (8). Akutt avstøtningsreaksjon kan også oppstå ved indirekte allogjenkjennelse, hvor mottakers APC presenterer donorderiverte peptider for mottakers T-celler. Immunresponsen amplifiseres ved cytokinproduksjon, generering av effektor-T-celler og antistoffproduserende B-celler, samt aktivering av makrofager (11). Akutt avstøtning kan forebygges og reduseres ved bruk av immundempende legemidler pre- og post-Tx (8).

### **Kronisk avstøtningsreaksjon**

Kronisk avstøtning skjer måneder eller år etter transplantasjon. Flere immunologiske mekanismer er trolig årsak til reaksjonen, blant annet skjer en deponering av antistoffer i transplantatets blodkar etter en reaksjon med HLA klasse I på endotelet i karene. Immunceller som interagerer med de deponerte antistoffene, gir kronisk inflammasjon og fortykkelse av lamina. Over tid vil dette medføre tettere blodkar i transplantatet slik at blodtilførselen til organet reduseres. Iskemi og funksjonstap inntreffer gradvis og fører til slutt til organdød (8).

## **1.2 Immundempende behandling**

Etter en allogen organtransplantasjon er man avhengig av livslang immundempende behandling for å hindre avstøtningsreaksjoner og bevare transplantatet. De immundempende legemidlene har smalt terapeutisk vindu, og man kombinerer legemidler med ulike virkemekanismer for å bedre bivirkningsprofilen, i tillegg til å oppnå synergistiske og additive effekter. Rett etter transplantasjon gis høye doser, da faren for avstøtning er stor. Dosene reduseres over tid til lavest effektive tolererte dose (14).

Ved transplantasjon av nyre følger de fleste pasienter et legemiddelregime bestående av en kalsineurinhemmer (CNI), glukokortikoider (GK) og IMPDH-hemmer. I noen tilfeller gis *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-hemmer i stedet for CNI. Under operasjonen og på dag 4 gis i tillegg interleukin (IL)-2-reseptorantistoffet basiliximab (13). IL-2 er viktig for T-cellers aktivering og differensiering, og basiliximab hemmer dermed T-celleproliferasjon (11).

Etter at nye immundempende legemidler ble tatt i bruk på slutten av 90-tallet og begynnelsen av 2000-tallet opplever færre pasienter akutt avstøtning av nyretransplantat. Data fra flere land viser at med dagens immundempende regime er insidens for akutt avstøtning < 15 %, og ett års graftoverlevelse er > 90 % (15).

### 1.2.1 Glukokortikoider

Allerede tidlig på 1950-tallet ble glukokortikoider (GK) tatt i bruk ved nyretransplantasjon, da sammen med helkroppsbestråling. Dette var den eneste immundempende behandlingen som ble gitt for å undertrykke avstøtningsprosesser (16). Nesten 60 år senere er GK fremdeles en viktig del av det immundempende regimet for transplanterte. Ved Rikshospitalet gis 250 mg metylprednisolon intravenøst (i.v.) på transplantasjonsdagen, deretter gis prednisolon peroralt (p.o.) i et fast nedtrappingsregime. Dosene trappes ned fra 20 mg til 5 mg, og kan hos noen pasienter seponeres etter 12 måneder. Ved avstøtningsepisoder gis metylprednisolon i.v. og økte doser prednisolon p.o. (13).

GK er potente, men lite selektive, og påvirker flere typer leukocytter. Molekylene er lipofile og krysser cellemembranen for så å binde til cytoplasmatiske reseptorer.

GK:reseptorkompleksene danner dimere og translokeres til cellekjernen, hvor de regulerer transkripsjon. I lymfocytter har GK negativ regulatorisk effekt på cytokiners genekspressjon ved å hemme transkripsjonsfaktorene aktivatorprotein-1 (AP-1) og nukleær faktor (NF)- $\kappa$ B. Dette reduserer blant annet produksjonen av IL-2 og andre interleukiner, interferon (IFN)- $\gamma$ , CD40-ligand, tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  og granulocytt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) (11). I tillegg til å påvirke genekspressjon har GK non-genomiske effekter som inntreffer raskt etter inntak av legemiddeldose. GK ser ut til å interagere direkte med cellemembranen og endre egenskaper til både cellemembranen og membranassosierte proteiner (17). GK kan gi lymfocytopeni ved å redistribuere sirkulerende lymfocytter, endre ekspressjon av adhesjonsmolekyler og indusere lysing av umodne T-lymfocytter. Hemming



av T-celler medfører også indirekte effekt på B-celler, som da mister T-cellehjelp for aktivering (11).

Prednisolon har nesten fullstendig absorpsjon etter oral administrasjon. Avhengig av konsentrasjon er proteinbindingen 60-95 %, og halveringstiden ( $t_{1/2}$ ) er ca 3 timer. Prednisolon utskilles via nyrene, enten i uendret form (20 %) eller som inaktive metabolitter (18).

Langtidsbruk av GK kan indusere eller forverre diabetes mellitus, arteriell hypertensjon og osteoporose. I tillegg kan pasientene få økt infeksjonstendens, tynnere hud, redistribuering av kroppsfett og dyslipidemi (18).

### 1.2.2 Kalsineurinhemmere

Siden ciklosporin A (CsA) kom på markedet i 1983 har kalsineurinhemmere (CNI) vært en hjørnestein i immundempende transplantasjonsbehandling. CsA økte korttidsoverlevelsen for nyreallograft, og gjorde hjerte-, lever- og pankreastransplantasjon vellykket nok til å innføres i klinisk praksis (19). CNI er mer selektive mot T-celler enn GK, og gir bedre bevaring av andre myeloidderiverte cellelinjer (11). Takrolimus kom på markedet i 1994 (20), og nyere studier har vist at takrolimus gir bedre effekt enn CsA, men er mer assosiert med diabetes som bivirkning (21). Ved Rikshospitalet får nå de fleste nyretransplanterte takrolimus, med en startdose på 0,04 mg/kg  $\times$  2. Pasienter med nedsatt glukosetoleranse får CsA med en startdose på 4 mg/kg  $\times$  2 (13).

Aktivering av T-celler via TCR gir økt frigjøring av kalsium fra intracellulære lagre, og den kalsiumavhengige fosfatasen kalsineurin (CN) aktiveres (8). CN er mest kjent for sin rolle i aktivering av T-celler. Den defosforilerer nukleær faktor i aktiverte T-celler (NFAT). Aktiv NFAT translokeres så til kjernen og assosierer med andre transkripsjonsfaktorer som AP-1. Dette resulterer blant annet i transkripsjon og produksjon av IL-2, som er viktig for videre aktivering og proliferasjon av T-celler. I tillegg induseres pro-inflammatoriske cytokiner som IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  og GM-CSF. CsA og takrolimus hemmer CN og gir dermed redusert IL-2-avhengig T-celleaktivering på et tidlig stadium i cellyklus, i overgangen fra G0 til G1 (22,23). De to CNI binder seg til hver sin gruppe av immunofiliner i cellen, CsA til cyklofiliner og takrolimus til FK506-bindende protein 12 (FKBP-12). CsA:cyklofilin-komplekset og takrolimus:FKBP-komplekset blokkerer det aktive setet på CN (22).

Både CsA og takrolimus har svært variabel absorpsjon som påvirkes av for eksempel alder, etnisitet og gastrointestinalt miljø (20). Den lave biotilgjengeligheten (10-30 %) skyldes hovedsakelig presystemisk effluks ved P-glykoprotein (P-gp) og metabolisme ved cytokrom P450 (CYP)3A4 og CYP3A5. Begge legemidlene bindes i stor grad til plasmaproteiner og røde blodceller, og skilles hovedsakelig ut som metabolitter via lever (24). Pasienter som uttrykker CYP3A5 har ca. 50 % høyere clearance av takrolimus enn de som ikke uttrykker CYP3A5. Dette kan bidra til de store interindividuelle farmakokinetiske forskjellene for takrolimus. Blant kaukasiere er det ca. 15 % som uttrykker CYP3A5. Blant asiater, svarte og latinamerikanere er andelen som uttrykker CYP3A5 mellom 45 og 85 % (25).

CNI er en av de mest effektive og mest brukte immundempende legemiddelgruppene hos transplanterte, men er slett ikke uten bivirkninger. Kronisk nefrotoksisitet i transplanterte og *in situ* nyrer har ført til forsøk på å utvikle CNI-frie immundempende legemiddelregimer. CNI gir i tillegg kardiovaskulære bivirkninger, spesielt hypertensjon, og økt insulinresistens, hvilket er ekstra uheldig da mange av nyrepasientene har diabetes. For sterk immundempende behandling ved bruk av CNI er relatert til økt infeksjonstendens. Bruk av CNI over tid har blitt assosiert med økt risiko for malignitet (22,26).

### 1.2.3 IMPDH-hemmeren mykofenolat

Mykofenolat (MPA) finnes som de to formuleringene mykofenolatmofetil (MMF) og enterodrasjert mykofenolat-natrium (EC-MPS). MPA, som er et fermenteringsprodukt fra flere Penicillin-arter, ble oppdaget allerede i 1893. Tidlige studier av stoffet viste at det hemmet bakterievekst. På 1980-tallet begynte man å vurdere MPAs potensial i et transplantasjonsregime, da immundempende effekter var kjente fra utprøvinger mot psoriasis. MMF ble i 1995 godkjent for forebygging av avstøtningsepisoder etter nyretransplantasjon (27). MMF i kombinasjon med CsA og GK har i flere studier gitt redusert allograftavstøtning etter nyretransplantasjon (28-30). I Norge, og verden for øvrig, har MPA i stor grad tatt over for antimetabolitten azatioprin, og er nå med i standard immundempende regime hos nyretransplanterte. Ved Rikshospitalet er startdosen for MMF 0,75 gram  $\times$  2 i kombinasjon med takrolimus, og 1 gram  $\times$  2 i kombinasjon med CsA (13).

MPA er en selektiv, reversibel og unkompetitiv hemmer av inosin 5'-monofosfat dehydrogenase (IMPDH), som katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i nysyntesen (*de novo*-syntese) av guaninnukleotider (31,32). IMPDH er en NAD<sup>+</sup>-avhengig dehydrogenase

som oksiderer inosin monofosfat (IMP) til xantosin monofosfat (XMP). XMP omdannes videre til blant annet guanosin trifosfat (GTP) og deoksy-GTP (dGTP), som er byggesteiner i henholdsvis ribonukleinsyre (RNA) og deoksyribonukleinsyre (DNA), og som er nødvendige for at lymfocytter skal gjennomgå mitogen transformasjon (33). Guaninnukleotider kan også produseres ved gjenvinning i cellen. I en gruppe hjertetransplanterte pasienter ble det etter konvertering fra azatioprin til MMF observert uendret nivå av purinnukleotider i PBMC, og økt nivå av enzymer i gjenvinningsbanen (34). I andre studier rapporteres det at celler med høy proliferasjonsgrad ser ut til å trenge mer purinnukleotider enn gjenvinningsbanene kan produsere. Dette kan forklare viktigheten av IMPDH og følgende MPAs selektive effekt i aktiverte lymfocytter (32,35).

Begge formuleringer av MPA har god absorpsjon etter oral administrasjon. MMF har en biotilgjengelighet på 80-95 % og EC-MPS på ca. 70 %. På grunn av enterodrasjeringen tar det ca. 4 timer før MPA fra EC-MPS når maksimum konsentrasjon ( $C_{maks}$ ). MMF hydrolyseres pre-systemisk til MPA, som når  $C_{maks}$  etter 1-2 timer. MPA fordeler seg nesten utelukkende i plasma, og bindes i stor grad til plasmaalbumin (98-99 % bindingsgrad). Metabolismen utføres hovedsakelig av uridindifosfat glukuronosyltransferaser (UGT) i lever, tarm og nyre til den inaktive metabolitten MPA-7-O-glukuronid (MPAG), og i mindre grad til det farmakologisk aktive MPA-acylglukuronidet (acMPAG). Metabolittene er hydrofile og skilles stort sett ut via nyrene (36). MPA gjennomgår enterohepatisk resirkulering ved at MPAG skilles ut med gallen i tarmen og spaltes av bakterielle glukuronidaser til MPA, som deretter reabsorberes. Dette bidrar med 10-60 % til den totale MPA-eksponeringen (37).

Vanlige bivirkninger av mykofenolat er kvalme, oppkast og diaré. Gastrointestinale bivirkninger fører til dosereduksjon eller seponering hos 40-50 % av pasientene som bruker MMF, og dosereduksjon er assosiert med dårligere langtidsutfall (38). Andre bivirkninger er leukopeni og økt infeksjonstendens (37).

## 1.2.4 mTOR-hemmere

På grunn av at nefrotoksisitet er en senbivirkning av CNI har det vært fokus på å utvikle nye immundempende legemiddelregimer som effektivt forebygger avstøtningsepisoder samtidig som de bevarer nyrefunksjonen ved langtidsbruk (39). På 1970-tallet ble det bakterielle produktet sirolimus isolert fra en jordprøve fra Påskeøya, og substansen viste seg å hemme celleproliferasjon og ha immundempende effekter. Everolimus ble senere syntetisert som en

struktur analog av sirolimus. Sirolimus ble i 1999 godkjent til forebygging av avstøtning etter nyretransplantasjon (40), og i 2003 ble everolimus godkjent på samme indikasjon (41).

Sirolimus og everolimus er proliferasjonssignalhemmere. De blokkerer vekstfaktorinduserte celledelingssignaler ved respons på alloantigener. I likhet med takrolimus binder mTOR-hemmerne til FKBP-12 i cytosol. Komplekset hemmer ikke CN, men *mechanistic target of rapamycin*-kompleks 1 (mTORC1). Slik hemmes signaloverføring fra blant annet IL-2-reseptor, og celledelingen hemmes på et senere stadium enn ved bruk av CNI. mTORC1 aktiverer p70S6-kinase, som medierer signaltransduksjon for protein- og DNA-syntese. Hemming av mTOR blokkerer cellesyklusprogresjon fra G1 til S-fase (23).

Syntetiseringen av everolimus var et forsøk på å lage en mer hydrofil mTOR-hemmer med forbedret farmakokinetikk (23). Både sirolimus og everolimus har lav biotilgjengelighet, men absorberes raskt med  $C_{maks}$  etter ca. 2 timer. Sirolimus har en  $t_{1/2}$  på ca. 60 timer og fri fraksjon på 8 %, mens everolimus har en  $t_{1/2}$  på ca. 30 timer og fri fraksjon på 26 %. Begge legemidlene metaboliseres av CYP3A4 i tarm og lever, i tillegg til å være substrater for efflukspumpen P-gp (42). Eliminasjon skjer omtrent utelukkende via lever (23,43).

Vanlige bivirkninger av sirolimus og everolimus er proteinuri, dyslipidemi, trombocytopeni, leukopeni, redusert sårtilheling og ødemer. En fordel med mTOR-hemmerne er at de har antineoplastisk effekt (43). Ved Rikshospitalet vurderes pasienter med tidligere malign sykdom med hensyn til bytte fra CNI til mTOR-hemmer syv uker etter nyretransplantasjon (13). Det foregår flere kliniske studier for å undersøke om mTOR-hemmere kan erstatte eller bidra til reduksjon av CNI-doser i transplantasjonsregimer (43).

### 1.3 Terapeutisk legemiddelmonitorering

De immundempende legemidlene har smale terapeutiske vinduer. For høye doser kan gi bivirkninger som infeksjoner, kreft og kardiovaskulær sykdom, og for lav dosering vil gi fare for avstøtningsreaksjoner. Det er viktig å oppnå tilstrekkelig immundemping og samtidig unngå alvorlige bivirkninger.

De immundempende legemidlenes farmakokinetikk varierer i stor grad mellom individer. Det er derfor vanlig med terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM), som innebærer å justere doseringen ut fra målte blod- eller plasmakonsentrasjoner av legemidlet. Bakgrunnen for

TDM er at farmakodynamiske effekter av mange legemidler stemmer bedre overens med blod- eller plasmakonsentrasjoner enn med den administrerte dosen. Den første dosen med immundempende legemiddel beregnes ofte ut fra pasientens kroppsvekt, og justeres så i forhold til målte konsentrasjoner i blod eller plasma. For en del av de immundempende legemidlene er det utarbeidet definerte konsentrasjonsområder som pasienten skal være innenfor (33).

Arealet under konsentrasjon-tidskurven (AUC) regnes som beste mål på legemiddeleksponering. For å regne ut AUC kreves flere konsentrasjonsmålinger på ulike tidspunkt etter inntak av legemiddeldose. Av praktiske hensyn har det blitt vanlig å måle enten  $C_0$ , konsentrasjonen rett før dose, eller  $C_2$ , konsentrasjonen to timer etter dose, avhengig av hvilken markør som korrelerer best med AUC (42).

### **1.3.1 Farmakokinetisk monitorering hos nyretransplanterte**

På Rikshospitalet monitoreres konsentrasjoner av CNI, MPA og mTOR-hemmere, men ikke GK, hos nyretransplanterte. For takrolimus måles  $C_0$  i fullblod, da  $C_0$  har vist seg å ha god korrelasjon med AUC fra 0-12 timer etter dose ( $AUC_{0-12t}$ ). Dag 0-180 tilstrebes  $C_0$  mellom 3-7  $\mu\text{g/L}$ , og etter dette 3-5  $\mu\text{g/L}$ . For CsA utføres  $C_2$ -monitorering i fullblod de første to månedene, da denne har vist seg å korrelere bedre med  $AUC_{0-12t}$  enn  $C_0$ . Etter de to første månedene utføres  $C_0$ -monitorering. Rett etter transplantasjon ønskes  $C_2$  mellom 900-1100  $\mu\text{g/L}$ . Etter dag 180 skal  $C_0$  være mellom 75-125  $\mu\text{g/L}$  (13,42).

Monitorering av MPA kan utføres ved hjelp av plasmakonsentrasjoner, men er et omdiskutert tema. Flere studier har vist sammenheng mellom lav  $AUC_{0-12}$  og akutt avstøtning hos nyretransplanterte, og det aksepterte terapeutiske vinduet for pasienter som i tillegg får CNI er AUC-verdier på 30-60  $\text{mg} \times \text{t/L}$ . Noen data viser at  $C_0$  ikke gir et fullgodt estimat av  $AUC_{0-12}$ , og flere algoritmer er derfor utviklet for å estimere AUC basert på to-tre målinger. Andre data viser at  $C_0$  kan være et godt estimat, og en konsensurrapport anbefaler ved nyretransplantasjon  $C_0$  på minimum 1,3  $\text{mg/L}$  hos pasienter som samtidig bruker CsA, og minimum 1,9  $\text{mg/L}$  for pasienter som bruker takrolimus. Det ble samtidig anbefalt at  $C_0$  bør holdes under 3,5  $\text{mg/L}$  (tilsvarer  $AUC_{0-12t}$  under 60  $\text{mg} \times \text{t/L}$ ) på grunn av manglende additiv effekt ved høyere konsentrasjoner (37).

Det er enighet om at  $C_0$  er et godt estimat for mTOR-hemmernes AUC. For pasienter med trippelregime bestående av CNI, GK og mTOR-hemmer tilstrebes  $C_0$  på 4-12  $\mu\text{g/L}$  for sirolimus og  $C_0$  på 3-8  $\mu\text{g/L}$  for everolimus (42).

### 1.3.2 Farmakodynamisk monitorering som ny strategi

Selv om ønsket blod- eller serumkonsentrasjon av immundempende legemidler oppnås, er det ofte forskjeller i farmakologisk effekt mellom transplanterte pasienter. Dette kan blant annet komme av varierende farmakodynamisk sensitivitet, som kan skyldes fysiologiske eller genetiske ulikheter, eller legemiddelinteraksjoner i kombinasjonsregimer (44). TDM er ikke alltid tilpasset pasientens individuelle immunsystem. Det er derfor fokus på å utvikle metoder for å observere forholdet mellom farmakokinetikk og farmakodynamikk, altså forholdet mellom legemiddeleksponering (blod- eller plasmakonsentrasjon av legemiddelet) og biologisk respons. Dette vil gi informasjon om et legemiddels eller legemiddelregimes effekt på individuelle pasienter (33).

For å evaluere enkeltpasienters immunforsvar i forhold til ulike immundempende legemidler kan det være hensiktsmessig å isolere mononukleære celler i perifert blod (PBMC) og gjøre farmakodynamiske målinger *ex vivo*. PBMC består i hovedsak av T- og B-celler. Ved å tilsette immundempende legemidler til PBMC *ex vivo* har det blitt påvist sammenheng mellom proliferasjonsgrad av PBMC og klinisk effekt av legemidlene. Dette kan potensielt brukes til å velge det legemidlet pasienten er mest sensitiv for (45). Det undersøkes også om man kan måle nivåer av spesifikke farmakodynamiske markører i PBMC, og utfra disse velge dosering som gir ønsket effekt.

## 1.4 Biomolekylære markører

En biologisk markør, eller biomarkør, er en biologisk parameter som måles objektivt og evalueres som en indikator på normale biologiske prosesser, patogene prosesser eller farmakologiske responser på en terapeutisk intervensjon. Gode biomarkører innen farmakodynamikk kan relatere legemidlers effekter på molekylære og cellulære prosesser til pasienters kliniske respons. Biomarkører med høy reproduserbarhet og god korrelasjon til kliniske endepunkter kan brukes for prediksjon og monitorering av klinisk respons på en legemiddelbehandling, og kan dermed brukes som en rettesnor for dosering av pasienter (46).

Dette vil være nyttig spesielt for legemidler med store variasjoner i interindividuell respons og smale terapeutiske vinduer, som immundempende legemidler.

Farmakodynamiske biomarkører innebærer nye metoder for å gradere oppnådd immundemping. Flere potensielle farmakodynamiske biomarkører har blitt identifisert for immundempende legemidler. Effekten av CNI kan kvantifiseres ved å måle kalsineurinaktiviteten, eller NFAT-regulert genekspressjon, og effekten av MPA ved å måle IMPDH-aktivitet. Dette er eksempler på spesifikke markører som gir et mål på den direkte biologiske responsen av ett enkelt legemiddel. I tillegg finnes generelle markører, som ikke er legemiddelspesifikke, men kan brukes til å evaluere den samlede effekten av et kombinasjonsregime. Generelle markører er indirekte relatert til den farmakodynamiske effekten av legemidler. For eksempel kan proliferasjonsgrad av immunceller brukes til kvantifisering av immunrespons ved et immundempende legemiddelregime (44). En annen generell markør på immundemping er nivået av adenosin trifosfat (ATP) i *ex vivo*-stimulerte CD4<sup>+</sup> celler (33).

Biomarkører kan gi viktig informasjon for riktigere dosering av pasienter og minimalisering av interindividuelle variasjoner i respons (46). De kan være nyttige for å identifisere pasienter i fare for å utvikle avstøtningsreaksjon, eller pasienter med høy risiko for bivirkninger. Måling av biomarkører i tillegg til legemiddelkonsentrasjoner kan bli et nyttig redskap for å forutse farmakodynamiske effekter hos pasienter. TDM er en veletablert rutine for flere immundempende legemidler, mens farmakodynamisk monitorering fremdeles brukes hovedsakelig på et eksperimentelt stadium og i kliniske forsøk. Det kreves flere studier for å velge de beste markørene for ulike immundempende legemidler og for å standardisere analytiske prosedyrer (33).

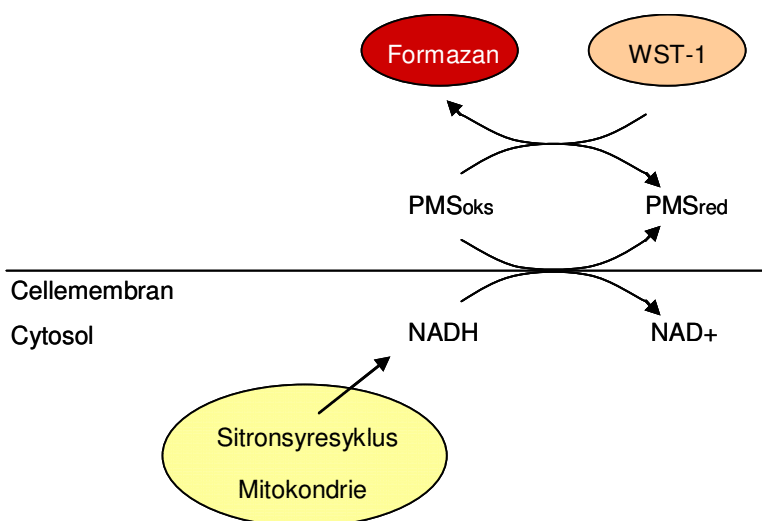
#### **1.4.1 Metabolsk aktivitet relatert til mitokondrielle dehydrogenaser**

Immuncellenes generelle metabolske aktivitet kan brukes i immunologisk monitorering som en generell markør på celleaktivitet eller celleproliferasjon. Siden alle de immundempende legemidlene påvirker cellenes evne til proliferasjon, kan metabolsk aktivitet gi et mål på total immundemping ved å beskrive aktiveringsgrad i immuncellene. Ved å tilsette ulike konsentrasjoner av immundempende legemidler til *ex vivo*-aktiverede PBMC kan det lages legemiddel-responskurver, og pasientens sensitivitet for de enkelte legemidlene kan detekteres og potensielt brukes til valg av regime og dosering. Pasienter med *ex vivo*-

stimulerte PBMC som har vist dårlig respons på GK har vist høyere risiko for akutt avstøtning under GK-terapi (45), og høy PBMC-sensitivitet for CsA har blitt korrelert med god graftoverlevelse (47).

Tetrazoliumsalter kan brukes til å kvantifisere metabolsk aktivitet i celleduspensjoner. Assay med tetrazoliumsalter måler ikke celleproliferasjon direkte, men enzymaktivitet relatert til cellulær metabolisme. Tetrazoliumsalter brukes i stor grad for å måle celleproliferasjon og hemming av celleproliferasjon (48).

*Water soluble tetrazolium salt 1* (WST-1) er et andre generasjons tetrazoliumsalt som danner vannløselige formazaner når det reduseres. WST-1 er negativt ladet og går ikke over cellemembranen. Reduksjonen skjer på celleoverflaten ved elektrontransport over plasmamembranen fra intracellulær nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) og via elektronbæreren fenazin metosulfat (PMS) til WST-1, som vist på figur 1. I prolifererende celler er det økt grad av elektrontransport over cellemembranen, og NADH fra mitokondriell sitronsyresyklus er den viktigste reduktanten for ekstracellulær WST-1. Etter reduksjon av WST-1 endres tetrazoliumsaltet til et rødfarget formazanprodukt som absorberer lys ved 450 nm, og kan måles ved hjelp av et spektrofotometer (48).



**Figur 1:** Reduksjon av WST-1 ved mitokondrielle dehydrogenaser. Vannløselig tetrazoliumsalt 1 (WST-1) reduseres til rødfarget formazan ved elektrontransport over plasmamembranen via elektronbæreren fenazin metosulfat (PMS), som reduseres av nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) fra mitokondriell sitronsyresyklus.



## 1.4.2 IMPDH-aktivitet

IMPDH katalyserer det hastighetsbestemmende trinnet i *de novo*-syntese av guanin- og deoksyguaninnukleotider. De to isoenzymene IMPDH type I og type II har tilsvarende katalytisk aktivitet, og begge er oppregulert i aktiverte T-celler. Likevel er enzymnivået av type II høyere enn type I både i hvilende og aktivert tilstand (49). MPA er en ca. 5 ganger sterkere hemmer av IMPDH type II enn type I, og dette kan være medvirkende til at MPA gir mer selektiv hemming av lymfocytter i forhold til andre celler (31). Nysyntesen av guanin er nødvendig for proliferasjon av både B- og T-celler.

Som farmakodynamisk biomarkør for MPA er det IMPDH-aktivitet som hittil ser mest lovende ut. Det har blitt observert 79 % (relativt standardavvik) interindividuell variasjon i IMPDH-aktivitet blant friske, og 42 % blant nyretransplanterte pasienter som brukte MPA (50). IMPDH-aktivitet har dermed potensial til å bedre individuell tilpassing av MPA-behandling. Maiguma *et al.* har vist at takrolimus, CsA og prednisolon ikke påvirker IMPDH-aktivitet ved tilsetning av legemiddel til non-stimulert PBMC-lysat, og IMPDH-aktivitet i sirkulerende lymfocytter kan trolig regnes som en spesifikk markør for MPA (51).

I en studie av nyretransplanterte har Glander *et al.* rapportert at lav IMPDH-aktivitet pre-Tx var assosiert med høyere insidens av bivirkninger og dosereduksjon post-Tx. Dosereduksjon hos pasienter med høy IMPDH-aktivitet pre-Tx var assosiert med avstøtningsepisoder (52). Chiarelli *et al.* har vist korrelasjon mellom avstøtningsepisoder og økende IMPDH-verdier basert på lineær regresjon av IMPDH-aktivitet mot 15 måneder oppfølgingstid hos den enkelte nyretransplanterte pasient. Høy variabilitet mellom pasienters enzymaktivitet gjorde at forfatterne stilte spørsmål ved nytten av enkeltmålinger av aktivitet, og heller konkluderte med at kontinuerlig IMPDH-monitorering kunne være aktuelt som prognostisk parameter for avstøtning (50). Både genetiske og ikke-genetiske faktorer er involvert i interindividuelle IMPDH-variasjoner. Diabetespasienter ser ut til å ha lavere IMPDH-aktivitet enn andre (53), og ulike genetiske varianter av IMPDH I og II har blitt assosiert med klinisk utfall etter transplantasjon (54-56).

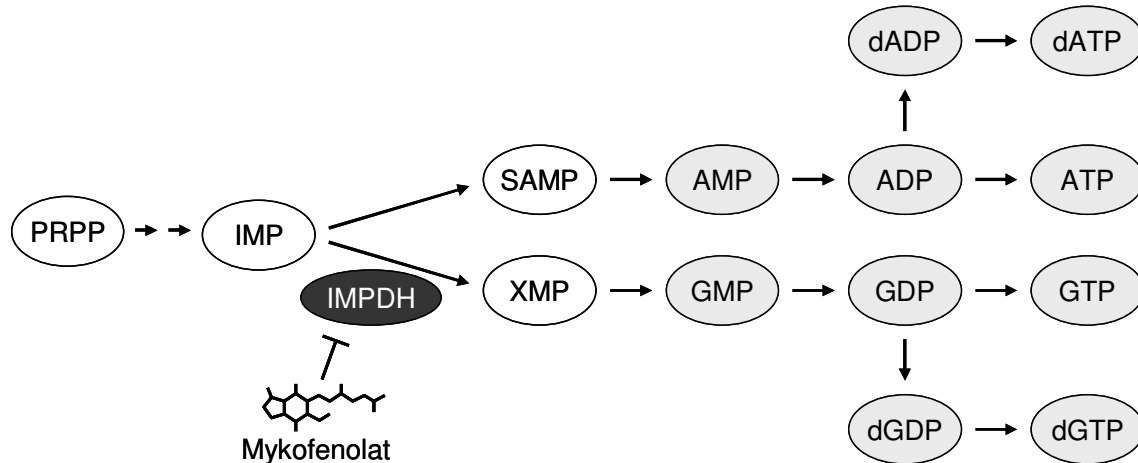
De foreløpige resultatene ser lovende ut for IMPDH-aktivitet som surrogatmarkør for MPA-mediert immundemping. Det er likevel mye som gjenstår før kombinasjonen av TDM og farmakodynamisk monitorering blir en del av klinisk praksis. Det må bli enighet om hvilken variabel som skal brukes til monitorering av IMPDH-aktivitet, enten det er arealet under

enzymaktivitetskurve, prosent hemming eller minimums- og maksimumsaktivitet. Det er heller ikke enighet om et standardisert assay, og assayene som brukes er krevende og dyre (35,57).

Hittil har studier av IMPDH-aktivitet vært utført i ikke-aktiverte lymfocytter (33). Ved å stimulere lymfocytene *ex vivo* og deretter inkubere cellene en viss tidsperiode, kan IMPDH-aktivitet kvantifiseres i en fremprovosert immunreaksjon. Dette kan brukes som mål på effekten av MPA i en reaksjon som etterligner en avstøtningsperiode. Det er tidligere vist at 72 timers inkubering av *ex vivo*-stimulerte PBMC kan egne seg til IMPDH-målinger. Stimulering av celler fra en frisk person som ikke var eksponert for MPA, medførte da 21 ganger økt IMPDH-aktivitet (58).

### 1.4.3 Purinbaser

Syntese av purinnukleotider er viktig for vedlikehold av normal cellefunksjon og -vekst, og er dermed viktig for immunresponsen. Purinnukleotider er involvert i flere anabole prosesser i cellen, blant annet transmembransignalering og syntese av RNA, DNA og proteiner (49). Ved nysyntese av purinnukleotider blir fosforibosylpyrofosfat (PRPP) via flere trinn omdannet til IMP. IMPDH omdanner IMP til XMP, som videre omdannes til guanosin mono-, di- og trifosfat (GMP/GDP/GTP) og deoksyguanosin di- og trifosfat (dGDP/dGTP). IMP omdannes via suksinyl adenosin monofosfat (SAMP) til tilsvarende adenin- og deoksyadeninnukleotider (figur 2). IMPDH er det hastighetsbestemmende enzymet i *de novo*-syntese av guaninnukleotider, og den metabolske konsekvensen av IMPDH-hemming kan relateres til mengde guanin- og deoksyguaninnukleotider i PBMC. Ved analyse kan man spalte av ribosefosfater fra nukleotidene ved kjemisk hydrolyse, og dermed bruke purinbasen guanin som et mål på den totale mengden guanin- og deoksyguaninnukleotider, adenin som et mål på adenin- og deoksyadeninnukleotider, og hypoxantin som et mål på IMP. Den forventede konsekvensen av IMPDH-hemming er redusert mengde guanin, og tidligere studier har vist samsvarende reduksjon av adenin samt forhøyede nivåer av hypoxantin (58,59). Purinbaser er dermed potensielle spesifikke farmakodynamiske biomarkører for MPAs effekt.



**Figur 2:** *De novo*-syntese av purinnukleotider fra fosforibosylpyrofosfat (PRPP) og hemming av inosin monofosfat dehydrogenase (IMPDH) ved mykofenolat. IMPDH oksiderer inosin monofosfat (IMP) til xantosen monofosfat (XMP), som videre omdannes til guanosen mono-, di- og trifosfat (GMP/GDP/GTP) og deoksyguanosen di- og trifosfat (dGDP/dGTP). Tilsvarende nukleotider av adenosin dannes via suksinyl adenosin monofosfat (SAMP).

Studier av MPAs effekt på purinnukleotider har ikke gitt samsvarende resultater. *In vitro* og *ex vivo*-studier i prolifererende celler har vist at mengden GTP reduseres ved stigende MPA-konsentrasjoner (60-62). Vethe *et al.* har i en *in vivo*-studie i friske personer vist en tendens til svak økning av GTP og ATP i sirkulerende CD4<sup>+</sup> celler etter inntak av MMF enkeltdoser, men ingen endring i nivåer av AMP, ADP eller GDP (63). Det har i en senere *in vivo*-studie av levertransplanterte blitt vist en reduksjon av mengde adenin og guanin ved behandling med MPA over tid, og en økning av hypoxantin. Adenin og guanin ble da spaltet av nukleotidene og brukt som samlede mål for henholdsvis adenin- og guaninnukleotider. Dette tyder på at IMPDH-hemming ikke gir umiddelbar, men heller langsiktig reduksjon av guanin i sirkulerende celler (59). Ved å måle purinbaser i *ex vivo*-stimulerte PBMC kan en avstøtningsepisode simuleres og effekten av MPA undersøkes. Tidligere resultater indikerer at både MPA og andre immundempende legemidler reduserer nivåene av purinbaser i *ex vivo*-stimulerte celler (58). Flere studier kreves for å undersøke om purinbaser kan brukes som farmakodynamiske markører for MPA.

#### 1.4.4 Cytokiner

Cytokiner er små celledesignaleringsproteiner som produseres av en rekke ulike celletyper, deriblant T- og B-celler. Ved en immunrespons blir cytokinproduksjonen oppregulert, og stimulerer blant annet T-celleproliferasjon, som er et viktig trinn i avstøtningsreaksjoner. Cytokiner virker i umiddelbar nærhet av produksjonscellen, og kun i korte perioder.

Membranbundne cytokiner kan kun utøve sin effekt på målcellen som T-cellen er bundet til, mens sekretede cytokiner kan diffundere i ekstracellulærvæsken og nå flere celler (8).

Ved avstøtningsreaksjoner infiltrerer alloreaktive T-celler graftet, hvor de sekreter cytokiner. Cytokinene bidrar til vedlikehold av inflammasjonen i graftet, og forhøyede serumnivåer av IL-17 har blitt påvist under avstøtningsepisoder (64). I tillegg har forhøyede serumnivåer av IL-6 pre-Tx blitt relatert til avstøtningsepisoder og tap av graft post-Tx (65). Immuncellers cytokinproduksjon kan brukes som en farmakodynamisk biomarkør for immundempende legemidler. En avstøtningsepisode kan etterlignes ved å stimulere fullblod eller PBMC *ex vivo*, og mengde cytokiner sekret fra cellene kan kvantifiseres i supernatanten (plasma og medium). Ved å utføre målingene før og etter legemiddelinntak kan immundempende legemidlers grad av hemming av cytokinsekresjon detekteres. Av de immundempende legemidlene er det CNI som har mest uttalt effekt på cytokinsekresjon, men ved et kombinasjonsregime kan det være vanskelig å skille ut om et enkelt legemiddel alene er ansvarlig for den cytokinhemmende effekten (22).

CN kontrollerer produksjon av IL-2 når T-celler aktiveres. IL-2 signaliserer videre aktivering av T-celler, B-celler, NK-celler og makrofager. Ved å redusere produksjonen av IL-2 stopper CNI T-celleaktiveringen på et tidlig stadium i celledelingen (8). Ved *in vitro*-stimulering av fullblod viste Böhler *et al.* at både takrolimus og CsA hemmet IL-2-ekspresjon, men verken MPA, sirolimus eller metylprednisolon endret ekspresjonen. Sekret IL-2 kan potensielt brukes som spesifikk markør for CNI (44).

TNF- $\alpha$  produseres av aktivert T-hjelpecelle (T<sub>H</sub>)-1 og makrofager, og bidrar til videre aktivering av makrofager og lymfocytter. Produksjonen av TNF- $\alpha$  reguleres av CN og reduseres dermed av CNI (22).

IL-10 er et anti-inflammatorisk cytokin som produseres av regulatoriske T-celler (Treg), dendrittceller og makrofager. Til tross for den anti-inflammatoriske effekten har forhøyede serumnivåer av IL-10 pre-Tx blitt assosiert med avstøtningsepisoder ved nyretransplantasjon (66,67). Det ble konkludert at høye nivåer av IL-10 indikerte en pågående inflammasjon som kunne forsterke immunresponsen mot graftet post-Tx (67).

IL-17 er et pro-inflammatorisk cytokin som produseres av T<sub>H</sub>-17-celler og flere andre immunceller. IL-17 rekrutterer immunceller til inflammasjonsstedet og bidrar til modning av

APC, og har de siste årene blitt relatert til graftavstøtning (68). Crispim *et al.* fant mer enn tre ganger høyere nivåer av IL-17 i serum fra pasienter med avstøtningsreaksjon for nyregraft sammenlignet med pasienter som ikke hadde avstøtningsreaksjon. Friske kontroller hadde ingen målbare IL-17-nivåer (64). Både GK (deksametason), CNI og MPA har vist seg å hemme produksjonen av IL-17 (69,70).

IL-6 induserer differensiering av naive T-celler til T<sub>H</sub>-17-celler. Forhøyet ekspresjon av IL-6 og IL-17 sammen har blitt assosiert med avstøtning av lungegraft i musemodeller (71). Forhøyede serumnivåer av IL-6 pre-Tx ble av Berber *et al.* assosiert med både avstøtningsepisoder og tap av nyregraft (65).

### **1.4.5 Ex vivo-immunaktivering**

Stimulering av lymfocytter kan brukes til å etterligne en avstøtningsrespons *ex vivo*. Dette kan enten gjøres ved spesifikk stimuli, altså donorderiverte celler, eller ved non-spesifikk stimuli, som for eksempel mitogenene phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) og ionomycin. Av praktiske hensyn er det mest vanlig å bruke non-spesifikk stimuli, slik at aktiveringen lett kan reproduseres (44). Etter en passende inkuberingstid kan farmakodynamiske biomarkører måles i de aktiverte cellene, og effekten av immundempende legemidler kan vurderes.

Ved stimulering med mitogener kan de reseptormedierede trinnene i T-celleaktivering forbigås. Når TCR-komplekset på overflaten av T-celler aktiveres, igangsettes en signalkaskade som blant annet fører til økt intracellulær konsentrasjon av kalsium (Ca<sup>2+</sup>) og diacylglycerol (DAG). Dette gir aktivering av proteinkinase C (PKC), som translokeres fra cytosol til nukleus og fører til økt transkripsjon av IL-2 og IL-2-reseptor, som bidrar til T-celleaktivering og -proliferasjon (72). PMA har strukturell likhet med DAG, og er en direkte aktivator av PKC (73). Ionomycin er en ionofor som frakter Ca<sup>2+</sup> over cellemembranen og øker den intracellulære Ca<sup>2+</sup>-konsentrasjonen, og er dermed en indirekte aktivator av PKC. Ionomycin har synergistisk effekt med PMA (74).

## 2 HENSIKT

Etter en nyretransplantasjon er pasientene avhengige av livslang immundempende behandling for å forebygge avstøtning av transplantatet. De immundempende legemidlene har smale terapeutiske vinduer, og det er viktig å få tilstrekkelig effekt samtidig som man unngår alvorlige bivirkninger. På grunn av farmakokinetisk variasjon mellom individer er det innført konsentrasjonsmålinger i fullblod eller plasma for å tilpasse doseringen til den enkelte pasient. Nyere forskning viser at det er stor variasjon også i den molekylære responsen mellom individer. Genetiske forhold og immunstatus kan påvirke dette.

Denne oppgaven utgjorde et delprosjekt hvor det ble utført farmakokinetiske og farmakodynamiske undersøkelser hos nyretransplanterte pasienter. Hensikten var å se hvordan responsmarkører i immunceller kan relateres til eksponering og effekt av immundempende legemidler hos nyretransplanterte. Det ble også utført forsøk med immunceller fra friske personer for å undersøke responsmarkørens legemiddelsektivitet under kontrollerte betingelser.

Det overordnede formålet med prosjektet var å øke kunnskapen om immundempende legemidlers virkemekanismer, i tillegg til å identifisere mulige farmakodynamiske biomarkører som kan brukes til å predikere eller reflektere klinisk effekt av immundempende legemidler hos nyretransplanterte pasienter.

## 3 MATERIALER

### 3.1 Utstyr

Beskrivelse	Navn	Produsent
Bio-Plex-instrument	Bio-Plex	Bio-Rad, Hercules, CA
Brett 96 brønner (klart)	96 well plates, Nunc	Thermo Scientific, Roskilde, Danmark
Celledyrkningsrør	Falcon-rør, 5mL Polystyrene Round-bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA
Celleteller	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter Brea, CA
Inkubatorskap	Thermo Scientific Forma, Steri cycle, CO <sub>2</sub> -incubator	Thermo Scientific, Tyskland
Kjølesentrifuge (4 °C) til mikrosentrifugerør	Jouan BR4i	Thermo Scientific, ON, Canada
Kjølesentrifuge (4 °C) til sentrifugerør	Kubota 5930 Universal Refrigerated Centrifuge	Kubota Corporation, Tokyo, Japan
Kolonner LC-MS/MS	Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 x 150 mm Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 x 10 mm	Waters, Manchester, UK
LC-MS/MS	Waters 2795 Separations Module, Waters Quattro micro API	Waters, Manchester, UK
Leucosep-rør	Leucosep-Tube, 12mL	Greiner Bio-One GmbH, Tyskland

Na-Heparin-rør	Sodium Heparin Tubes	BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK
Mikrosentrifugerør	Sarstedt Tube 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Tyskland
Pipettespisser	Art® Aerosol resistant tips	Molecular BioProducts, Thermo Fischer Scientific, Tyskland
Plateleser	Wallac 1420 Victor Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham, MA
Platerister	Wallac 1296-001 Delfia plateshake	PerkinElmer, Waltham, MA
Polypropylenrør 1,5 mL med lav proteinbinding	Protein LoBind Tube, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Programvare Bio-Plex	Bio-Plex Manager™	Bio-Rad, Hercules, CA
Programvare LC-MS/MS	MassLynx	Waters, Manchester, UK
Programvare, nonlinear regresjon	GraFit, versjon 5	Erithacus Software, Surrey, UK
Programvare statistiske analyser	SPSS 18.0	SPSS Inc., Chicago, IL
Sentrifuge (romtemperatur)	Megafuge 1.0	Heraeus instruments, Hanau, Tyskland
Sentrifuge (mikrosentrifugerør, 4 °C)	Jouan BR4i	Thermo Scientific, ON, Canada
Sentrifugerør	Falcon-rør, 14 mL Polystyrene Round-bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ



Vannbad	Gran ristevannbad Modell OLS 200	Grant, Cambridge, UK
Varmeblokk	Techne Dri-Block, DB-3	Techne, Cambridge, UK
Vortexmixer	Vortex Genie 2	Scientific Industries INC, Bohemia, NY
Ultralydbad	Branson 1210	Branson, Danbury, CT

## 3.2 Reagenser

Beskrivelse	Navn	Produsent
Acetonitril (ACN)	Acetonitrile, HPLC grade	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Adenosinmonofosfat (AMP)	Adenosine 5'- monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ammoniumacetat	Ammonium acetate, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Bio-Plex™ Cytokine Assay	Bio-Plex™ Cytokine Assay	Bio-Rad, Hercules, CA
BSA	Albumin solution from bovine serum, 30 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -adenine	Adenine ( <sup>13</sup> C <sub>5</sub> )	Larodan Fine Chem, Malmö, Sverige
<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -guanine	Guanine (8- <sup>13</sup> C; 7,9- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )	Cambridge Isotope Lab, Andover, MA
Ciklosporin A	Cyclosporin A	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada

D <sub>2</sub> -hypoxantin	Hypoxantin (D <sub>2</sub> )	Camebridge Isotope Lab, Andover, MA
Ditriotreitol (DTT)	DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich, St-Louis, MO
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, anhydrous	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Everolimus	Everolimus	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada
Fosfatbufret saltvann	PBS, BioWhittaker	Lonza, Verviers, Belgia
Guanosinmonofosfat (GMP)	Guanosine 5'- monophosphate disodium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Inosinmonofosfat (IMP)	Inosine 5'-monophosphate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Ionomycin	Ionomycin Calcium salt from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich, St. Louis MO
Isoton væske til celledelling	Coulter Isoton Diluent	Beckman Coulter, Brea, CA
Kaliumacetat (KAc)	Potassium acetate	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Kaliumklorid (KCl)	Potassium chlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Kalveserum (FBS)	Newborn Calf Serum, from bovine calves	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Maursyre	Formic acid, LC-MS grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO

Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Methanol	Rathburn Chemicals, Walkerburn, Scotland
Mykofenolat	Mycophenolic acid	Toronto Research Chemicals (TRC), Ontario, Canada
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Xanthin	Xanthine (1,3- <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )	Larodan Fine Chem, Malmö, Sverige
Nikotinamid-adeninnukleotid (NAD)	B-Nicotineamide adenine dinucleotide hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Penicillin-Streptomycin	Pen-Strep 10 000 U Penicillin/mL 10 000 U Streptomycin/mL	Lonza, Verviers, Belgia
Perklorisyre (HClO <sub>4</sub> )	Perchloric acid 70 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
PMA	Phorbol 12-myristate 13- acetate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Prednisolon	Prednisolone	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
RPMI 1640	RPMI 1640Medium with L- Glutamin and NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
Takrolimus	FK-506 monohydrat	Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA
Tris-hydroklorid (Tris-HCl)	Trizma buffer substance	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Vann	Filtrert, ionebyttet vann fra Milli-Q vannrensesystem	Millipore, Billerica, MA
WST-1 (Celleproliferasjonsreagens)	Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostic, Mannheim, Tyskland

Xantosin

Xanthosine (x2H<sub>2</sub>O)

Sigma-Aldrich, St. Louis,  
MO

---

Assay-buffer:

Tris-hydroklorid 250 mmol/L, EDTA 7,50 mmol/L, KCl 250 mmol/L og DTT 5,00 mmol/L

Internstandardløsning:

<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-xantin (25 μmol/L), D<sub>2</sub>-hypoxantin (25 μmol/L), <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-guanin (25 μmol/L) og <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-adenin (25 μmol/L)

Kaliumacetat:

4,0 mol/L

Medium med stimulanter:

RPMI 1640 tilsatt 200 U/mL Penicillin-Streptomycin og PMA og ionomycin med sluttkonsentrasjon på henholdsvis 100 ng/mL og 5 μg/mL

Medium uten stimulanter:

RPMI 1640 tilsatt 200 U/mL Penicillin-Streptomycin og 0,30 % (v/v) DMSO

Medium til cytokinanalyse:

RPMI 1640 tilsatt 0,5 % BSA

Mobilfase:

Ammoniumacetat 2 mmol/L, maursyre 0,1 % (v/v), acetonitril 3 % (v/v) og vann 97 % (v/v)

Perklorsyre stoppreagens/fellingsreagens:

4,0 mol/L

Substrat/kofaktørløsning:

IMP 1,80 mmol/L og NAD 0,40 mmol/L

## Kalibratorer

	Xantosin ( $\mu\text{mol/L}$ )	IMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )
Blank	0	0	0	0
Kalibrator 1	0,50	0,50	1,00	2,50
Kalibrator 2	2,50	1,00	5,00	12,5
Kalibrator 3	10,0	10,0	20,0	50,0
Kalibrator 4	50,0	40,0	100	250
Kalibrator 5	100	80	200	500

## Kontroller

	Xantosin ( $\mu\text{mol/L}$ )	IMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	GMP ( $\mu\text{mol/L}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/L}$ )
Kontroll lav	0,50	0,50	1,00	2,50
Kontroll middels	10,0	10,0	20,0	50,0
Kontroll høy	100	80	200	500

## 4 METODER

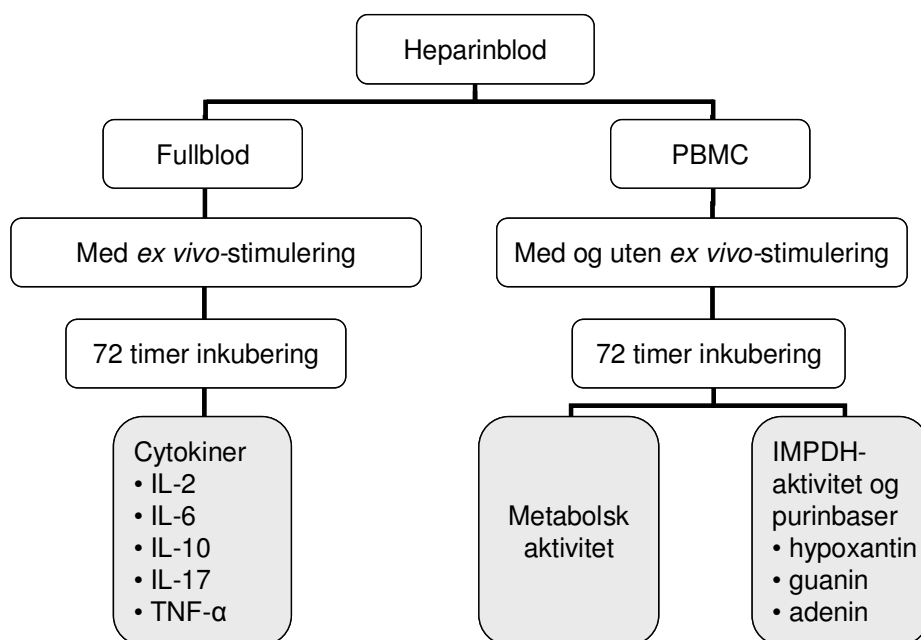
### 4.1 Studie av biomarkører hos nyretransplanterte

Denne masteroppgaven var en del av studien ”Molekylære biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte: En pilotstudie” ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. Professor Stein Bergan var prosjektleder og overlege Karsten Midtvedt var klinisk ansvarlig. Studien var godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK), og skriftlig informert samtykke ble innhentet fra alle deltakende pasienter.

Hensikten med studien var å optimere og validere laboratorieanalyser av biomarkører, gi ny kunnskap om immundempende legemidlers virkemekanismer, og om mulig å generere hypoteser om mulige diagnostiske biomarkører ved å vurdere forholdet mellom biomarkører og klinisk utfall etter nyretransplantasjonen. Studien var en kohort observasjonsstudie. Pasienter over 18 år som skulle motta nyre fra levende donor ble fortløpende spurt om å delta i pilotstudien, som til sammen skulle ha 30 pasienter. Pasientene ble behandlet i henhold til standard immundempende protokoll for nyretransplanterte ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet.

I forbindelse med rutinemessig blodprøvetaking ble det tatt ekstra blodprøveglass 0-4 dager før transplantasjon (pre-Tx), samt 6-9 dager, 5-7 uker og 1 år etter transplantasjon (post-Tx). Post-Tx ble prøvene tatt rett før og 1,5 time etter dosering av immundempende legemidler på morgenen. Blodprøvevolumet var 18,5 mL før transplantasjon og 14,5 mL ved hver prøvetaking etter transplantasjon.

For å vurdere pasientenes sensitivitet for immundempende legemidler ble det fra pre-Tx-prøvene laget legemiddelresponskurver med metabolsk aktivitet (WST-1) som markør. PBMC ble isolert, og i parallell med og uten *ex vivo*-stimulering ble det målt metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet og nivå av purinbaser. Det ble også målt mengde cytokiner utskilt i stimulert fullblod. Figur 3 gir en oversikt over hvilke markører som ble målt.



**Figur 3:** Oversikt over de farmakodynamiske markørerne som ble analysert i masteroppgaven.

## 4.2 Isolering av mononukleære celler i blod

Na-heparinrør med blod ble vendt 6-8 ganger før de ble sentrifugert ved 1000 g i 10 minutter (4 °C). Plasma ble overført til et nytt rør uten antikoagulant. Det ble tilsatt samme volum kaldt fosfatbufret saltvann (PBS) som fjernet plasma. Blod/PBS ble så blandet 1:1 med kald PBS. Blandingen ble overført til Leucosep-rør og sentrifugert ved 1000 g i 10 minutter (4 °C). PBMC var da blitt separert fra blodet og lå over polypropylenmembranen i Leucosep-røret. Øverste lag av løsningen i røret (plasma, PBS og blodplater) ble pipettert av til det var igjen ca 5 mm over PBMC. PBMC og resten av væsken over membranen ble overført til nytt Falcon-rør, tilsatt 5 mL kald PBS og blandet. Dette ble sentrifugert ved 250 g i 10 minutter (4 °C). Supernatanten med blodplater ble fjernet og de mononukleære cellene ble resuspendert i 1,00 mL kaldt medium (RPMI 1640).

De mononukleære cellene ble talt med en Coulter partikkelteller. Ti µL cellesuspensjon ble overført til 19 mL isoton væske. Partikkeltelleren ble stilt inn på partikkelstørrelse 5-15 µm og fortynningsfaktor 1901. Hver prøve ble talt to ganger og gjennomsnittsverdien ble brukt for videre fortynning.

## 4.3 Analyse av metabolsk aktivitet

### 4.3.1 *Ex vivo*-stimulering av PBMC

PBMC-suspensjonen ble fortynnet med RPMI og 20 % heparinplasma fra opprinnelig prøve til 800 000 celler/mL. Femti  $\mu\text{L}$  cellesuspensjon ble overført til brønner i 96 brønners brett og tilsatt 50  $\mu\text{L}$  medium med eller uten stimulanter. Medium med stimulanter inneholdt Penicillin-Streptomycin 200 U/mL, PMA 100 ng/mL og ionomycin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Medium uten stimulanter inneholdt Penicillin-Streptomycin 200 U/mL og DMSO 0,30 % (v/v). Blanke brønner ble tilsatt 50  $\mu\text{L}$  RPMI med 20 % plasma fra opprinnelig prøve og 50  $\mu\text{L}$  medium uten stimulanter. Brettet ble satt på platerister ved hastighet 300 rotasjoner per minutt (rpm) i 60 sekunder, og deretter plassert i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luftfuktighet i 68 timer.

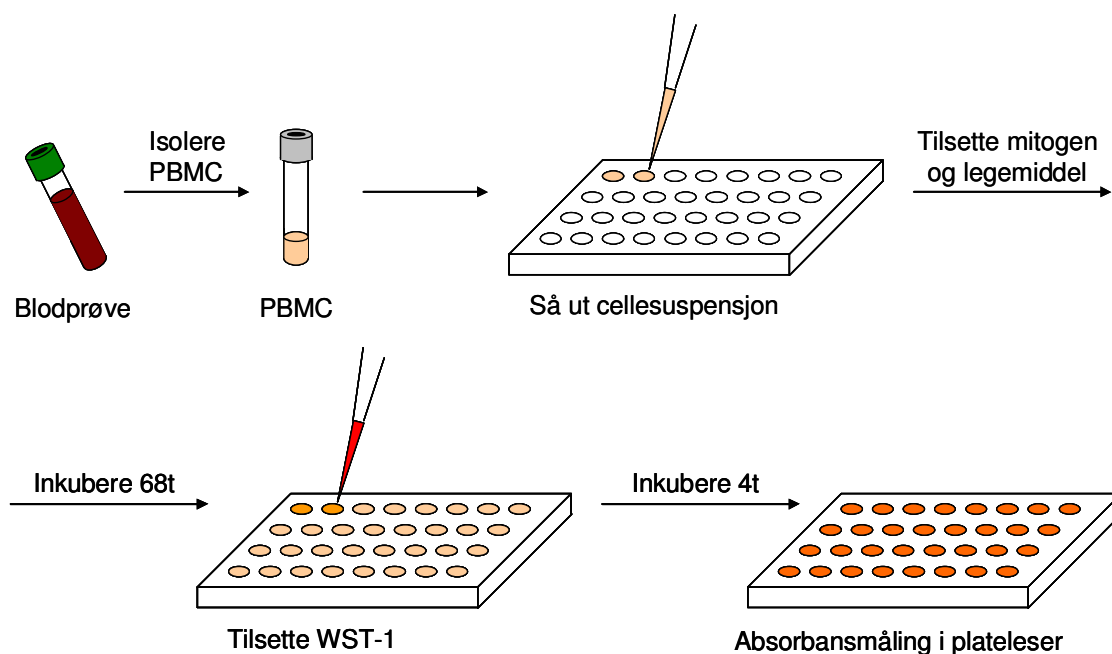
### 4.3.2 Metabolsk aktivitet som responsmarkør for immundempende legemidler

Før transplantasjon ble pasientens sensitivitet for takrolimus, mykofenolat og everolimus målt med metabolsk aktivitet som responsmarkør. Brønner i 96 brønners brett ble tilsatt 2  $\mu\text{L}$  legemiddelløsning (løst i metanol) i stigende konsentrasjoner (tabell A). Det ble overført 50  $\mu\text{L}$  cellesuspensjon som inneholdt 800 000 celler/mL og 20 % heparinplasma fra opprinnelig prøve, og deretter ble 50  $\mu\text{L}$  medium med stimulanter tilsatt til brønner med legemiddel i. Blanke brønner ble tilsatt 2  $\mu\text{L}$  metanol, 50  $\mu\text{L}$  RPMI med 20 % plasma fra opprinnelig prøve og 50  $\mu\text{L}$  medium uten stimulanter. Gjennomsnittet av blanke brønner ble trukket fra som bakgrunn. Kontrollbrønner ble tilsatt 2  $\mu\text{L}$  metanol, 50  $\mu\text{L}$  cellesuspensjon og 50  $\mu\text{L}$  medium uten stimulanter. Blanding av innholdet i brønnene ble utført ved å sette brettet på platerister ved hastighet 300 rpm i 60 sekunder. Brettet ble så plassert i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luftfuktighet i 68 timer. Prøveopparbeidelse for pasienters legemiddelsensitivitet er illustrert i figur 4.



**Tabell A:** Legemiddelkonsentrasjoner brukt til responskurver

Legemiddel	Sluttkonsentrasjoner i brønn							
Takrolimus (nmol/L)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,50	10,0	100
Mykofenolat ( $\mu$ mol/L)	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,00	6,00	60,0
Everolimus (nmol/L)	0,10	0,25	1,00	2,50	10,0	100	1000	5000



**Figur 4:** Prøveopparbeidelse for pasienters legemiddelsensitivitet. PBMC (mononukleære celler i perifert blod) ble isolert fra blodprøve og sådd ut i 96 brønners Brett. Legemiddelløsning i stigende konsentrasjoner og mitogen ble tilsatt brønnene før inkubering i 68 timer. Tetrazoliumsaltet WST-1 ble tilsatt for å kvantifisere metabolsk aktivitet av mitokondrielle dehydrogenaser. Brettet ble videre inkubert i 4 timer før absorbansmåling.

### 4.3.3 Kvantifisering av metabolsk aktivitet

Metabolsk aktivitet ble kvantifisert ved hjelp av celleproliferasjonsreagenset WST-1, og i henhold til produktbeskrivelsen til Cell Proliferation Reagent WST-1. Dehydrogenaser i prolifererende celler omdanner WST-1 til rødfarget formazan, som absorberer lys ved 450 nm. Antall metabolsk aktive celler og mengde formazan som dannes korrelerer direkte, og kan kvantifiseres ved absorbansmåling.

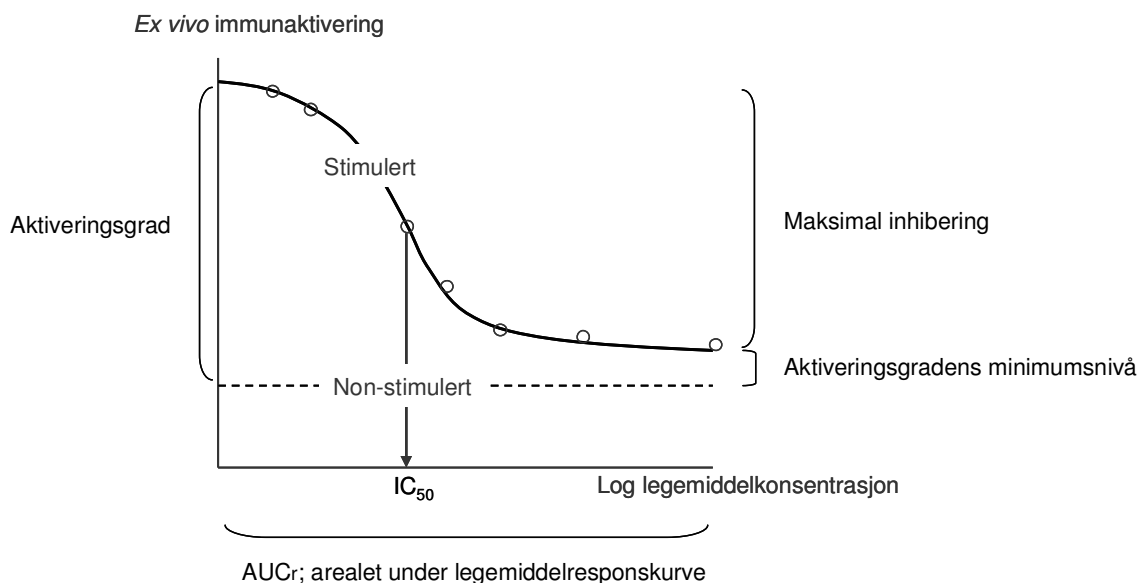
Etter 68 timers inkubering ble hver brønn tilsatt 10  $\mu$ L WST-1, og brett med lokk ble satt på platerister ved hastighet 300 rpm i 60 sekunder. Brettet ble videre inkubert i 4 timer ved

samme betingelser som før. Etter inkubering ble brettet tildekket med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys og begrense påvirkning av bakgrunnsabsorbans. Brettet ble satt på platerister i 60 sekunder ved 300 rpm, før det ble plassert i plateleser og absorbansen ved 450 nm ble lest av (1 sekund måling per brønn).

Presisjon innen analyseserier er tidligere dokumentert for metoden. Metabolisk aktivitet måles med  $VK < 10\%$  (58).

#### 4.3.4 Beregninger av aktiveringsgrad og responskurver

Ved beregning av aktiveringsgrad ble bakgrunnsabsorbansen i blanke prøver (uten celler) trekt fra absorbansen i prøver med celler. Aktiveringsgrad ble beregnet som ratio mellom absorbansen i stimulerede celleprøver og absorbansen i non-stimulerede celleprøver (kontrollbrønner). Legemiddelresponskurver og variablene som beskriver disse (legemiddelkonsentrasjon som gir 50 % inhibering av aktiveringsgrad, maksimal relativ inhibering og aktiveringsgradens minimumsnivå) ble estimert ved hjelp av nonlinear regresjonsanalyse (4 parameters ligning, GraFit versjon 5 programvare). Arealet under legemiddelresponskurven ( $AUC_r$ ) ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden basert på faktiske målinger. Variabler som beskriver legemiddelresponskurver er illustrert i figur 5.



**Figur 5:** Variabler som beskriver legemiddelresponskurver. Aktiveringsgrad beregnes som ratio mellom stimulerede og non-stimulerede PBMC, maksimal inhibering er forskjell mellom maksimum og minimum immunaktivering, aktiveringsgradens minimumsnivå er minimum aktiveringsgrad i stimulerede celler,  $IC_{50}$  er legemiddelkonsentrasjon som gir 50 % inhibering av aktiveringsgrad og  $AUC_r$  er arealet under legemiddelresponskurve beregnet som aktiveringsgrad  $\times$  konsentrasjon ved hjelp av trapesmetoden.

## 4.4 Analyse av IMPDH-aktivitet og purinbaser

### 4.4.1 *Ex vivo*-stimulering av PBMC

Etter celledetelling ble PBMC-suspensjonen fortynnet med RPMI og 20 % heparinplasma fra opprinnelig prøve til 1 600 000 celler/mL. To volumer på 200 µL cellesuspensjon ble overført til celledyrkningsrør. Et likt volum (200 µL) medium med stimulanter ble tilsatt det ene røret, og 200 µL medium uten stimulanter ble tilsatt det andre røret. Korkene ble festet løst på celledyrkningsrørene for å gjøre gassutveksling mulig, og rørene ble satt til inkubering ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luftfuktighet i 72 timer.

Etter inkubering ble cellesuspensjonen blandet forsiktig og sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °C). Supernatant (2 × 100 µL) ble fryst ned ved – 70 °C for senere analyse av cytokiner, og det ble tilsatt 500 µL PBS for resuspending av cellene. Suspensjonen ble blandet og sentrifugert ved 2350 g i 2 minutter (4 °C). Supernatanten ble fjernet og cellene ble tilsatt 125 µL vann og vortexet i 5 sekunder for cellelysering. Prøvene ble deretter oppbevart ved – 70 °C inntil videre analyse.

### 4.4.2 Kvantifisering av IMPDH-aktivitet og purinbaser

#### Prøveopparbeidelse

Cellelysatet ble tint ved romtemperatur i 20 minutter og homogenisert ved 30 sekunder vortexing, 120 sekunder ultralydbad og videre vortexing i 5 sekunder. Prøvene ble så sentrifugert ved 1150 g i 2 minutter (4 °C).

To volumer på 50 µL cellelysat ble overført til 1,5 mL mikrosentrifugerør, og 50 µL kalibratorer, kontroller og vann (bakgrunnsprøve) ble tilsatt tilsvarende rør. Rørene ble tilsatt 50 µL assay-buffer bestående av trishydroklorid (Tris-HCl) 250 mmol/L, EDTA 7,5 mmol/L, kaliumklorid (KCl) 250 mmol/L og ditiotreitol (DDT) 5,0 mmol/L. Det ene røret med cellelysat og 3 bakgrunnsprøver ble tilsatt 25 µL substrat/kofaktorløsning (IMP 9,0 mmol/L og NAD 2,0 mmol/L) for kvantifisering av IMPDH-aktivitet, før de ble vortexet i 5 sekunder og inkubert ved 37 °C i 120 minutter. Inkuberte rør ble sentrifugert ved 1150 g i 20 sekunder. Det ble tilsatt 25 µL vann til kalibratorer og til røret med cellelysat som ikke skulle inkuberes,

samt til kontroller med kjente nivåer av purinbasene. Alle rør ble tilsatt 20 µL perklorsyre (HClO<sub>4</sub>) 4,0 mol/L for å stoppe enzymreaksjonen og felle ut proteiner.

Alle rør bortsett fra en negativ kontroll (dobbelblank) ble tilsatt 20 µL internstandardløsning som inneholdt <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-xantin, D<sub>2</sub>-hypoxantin, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-guanin og <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-adenin (25 µmol/L av hver). Prøvene ble vortexet 10 sekunder før sentrifugering ved 9400 g i 4 minutter (4 °C). Et supernatantvolum på 120 µL ble overført til 250 µL glassinsert i 2 mL vial. Vialene ble satt på varmeblokk ved 100 °C i 60 minutter for hydrolyse av purinnukleotider til frie purinbaser og ribose. Prøvene ble avkjølt ved romtemperatur i 10 minutter og tilsatt 15 µL kaliumacetat (KAc) 4,0 M for å felle ut kaliumperklorat. Vialene ble vortexet i 5 sekunder og sentrifugert ved 2000 g i 5 minutter (romtemperatur). Prøvene ble plassert i autosampler i LC-modulen.

## LC-MS/MS

Purinbasene xantin, hypoxantin, adenin og guanin ble kvantifisert ved hjelp av væskechromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Instrumentets LC-modul var en Waters 2795 Separations Module og MS-modulen var Waters Quattro micro API med elektroprayionisering.

Prinsippet for separasjon var omvendt-fase-kromatografi, og kolonnen var en Waters Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 150 mm, med forkolonne Waters Atlantis T3 C18 3 µm, 2,1 × 10 mm. Mobilfasen bestod av 3 % acetonitril i vann med 0,1 % (v/v) maursyre og 2,0 mmol/L ammoniumacetat. Acetonitril avgjør løsemiddelstyrken, maursyre og ammoniumacetat virker som en pH-stabiliserende buffer. Mobilfasehastigheten var 0,150 mL/minutt og injeksjonsvolumet var 30 µL. Mellom injeksjonene ble injeksjonsnålen vasket med 5 % acetonitril i vann. Prøvene ble injisert med 8 minutters mellomrom og mobilfasen ble ført inn i massespektrometeret mellom 4,5 og 7,9 minutt.

Elektrospray ble brukt som fordampings- og ioniseringsteknikk og positive ioner i gassfase ble ført inn i massespektrometeret. Kapillærspenningen ble satt til 3,00 kV, ioneildetemperatur var 120 °C og gassfasetemperatur 400 °C. Nitrogen ble brukt som nebulisatorgass (650 L per time) og cone-gass (50 L per time). Molekylionene ble fragmentert ved hjelp av argongass justert til  $3,5 \times 10^{-3}$  mBar. Betingelser for hvert enkelt molekylions masse/ladning (m/z)-overgang er angitt i tabell B.

**Tabell B:** Betingelser for masse/ladning (m/z)-overganger

Analytt (internstandard)	Forløperion (m/z)	Produksjon (m/z)	Dwell-tid (sek)	Conespenning (V)	Kollisjonsenergi (eV)
Xantin	152,95	109,95	0,350	32	17
( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -xantin)	154,95	110,97	0,350	34	17
Hypoxantin	136,90	109,95	0,300	40	20
(D <sub>2</sub> -hypoxantin)	138,98	110,98	0,300	40	18
Guanin	151,95	134,95	0,225	37	18
( <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> -guanin)	154,96	137,96	0,225	35	17
Adenin	135,95	118,95	0,050	39	20
( <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -adenin)	141,03	123,91	0,050	39	20

Protonerte molekylioner ble analysert ved hjelp av multiplere reaksjonsmonitorering (MRM)

Waters MassLynx programvare ble brukt til dataanalysen. Toppene i kromatogrammene ble integrert, og ratio mellom topparealet til analytter og internstandarder ble brukt som respons. Det ble anvendt lineære kalibreringskurver med 1/x vektning (ikke tvunget gjennom origo). Kalibratorkonsentrasjoner som ble brukt var xantosin 0,50 – 2,50 – 10,0 – 50,0 – 100 µmol/L, IMP 0,50 – 1,00 – 10,0 – 40,0 – 80,0 µmol/L, guanosin monofosfat (GMP) 1,00 – 5,00 – 20,0 – 100 – 200 µmol/L og adenosin monofosfat (AMP) 2,50 – 12,5 – 50,0 – 250 – 500 µmol/L. IMPDHs enzymaktivitet ble beregnet som maksimal produksjonshastighet av XMP gjennom inkuberingsintervallet, og ble målt som xantin (pmol XMP/10<sup>6</sup> celler/minutt). Xantinverdier målt i bakgrunnsprøver ble trukket fra prøvesvarene.

Presisjon og nøyaktighet innen og mellom analyseserier er tidligere dokumentert for metoden. Purinbasene måles med variasjonskoeffisienter (VK) lavere enn 10 %, og nøyaktighet er mellom 96 og 110 %. IMPDH-aktivitet måles med VK < 15 %, og nøyaktighet mellom 90-111 %.

## 4.5 Analyse av cytokiner

### 4.5.1 *Ex vivo*-stimulering av fullblod

Et volum på 200  $\mu$ L fullblod ble overført fra Na-heparinrør til 5 mL celledyrkningsrør, og deretter ble 200  $\mu$ L stimuleringsmedium med PMA og ionomycin overført til røret. Innholdet ble blandet forsiktig før røret ble plassert i inkubatorskap ved 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luftfuktighet i 72 timer. Etter inkubering ble røret sentrifugert ved 1000 g i 5 minutter (4 °) før 2 × 100  $\mu$ L supernatant ble pipettert av og fryst ned ved – 70 °C i 1,5 mL LoBind-rør.

### 4.5.2 Kvantifisering av cytokiner

Utskillelse av IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$  kan kvantifiseres ved hjelp av et multiplex assay basert på Luminex-teknologien (75). Protokollen for Bio-Plex™ Cytokine Assay ble fulgt. For å skille cytokinene fra hverandre brukes magnetkuler med antistoffer som binder til hver sitt cytokin. Magnetkulene er fluorescensmerkede med spesifikk fluorescens for hvert enkelt cytokin. Magnetkulene er fluorescensmerkede med spesifikk fluorescens for hvert enkelt cytokin. Deteksjonsantistoffer merket med det fluorescerende stoffet phycoerythrin (PE) binder til cytokiner som er bundet til magnetkulene, og cytokinene detekteres så i en Luminex-basert plateleser. De fluorescensfargede magnetkulene eksiteres av en rød (635 nm) laserstråle, og emisjonssignalet brukes til identifisering av cytokinet. En grønn (532 nm) laserstråle eksiterer PE og genererer et kvantitativt signal.

### Prøveopparbeidelse

Supernatant fra inkubert fullblod ble tint ved romtemperatur i 20 minutter og deretter satt på is. Standardprøven ble rekonstituert i 500  $\mu$ L RPMI 1640 med 0,5 % albuminløsning fra bovin serum (BSA), vortexet i 30 sekunder og satt på is i 30 minutter. Det ble laget en standardrekke med åtte konsentrasjoner. Et volum på 128  $\mu$ L rekonstituert standardløsning ble overført til et mikrosentrifugerør med 72  $\mu$ L medium med 0,5 % BSA, og røret ble vortexet i 5 sekunder. Standardrekken ble tillaget ved fire ganger fortykning fra standard 1 til standard 8. Løsningene ble vortexet 5 sekunder mellom hver overføring. Kalibreringsområdet til cytokinene var: IL-2 (2,8-11 349 pg/mL), IL-6 (1,6-26 086 pg/mL), IL-10 (1,5-25 133), IL-17 (6,9-28 099) og TNF- $\alpha$  (5,7-23 271 pg/mL).

Supernatant fra stimulert fullblod ble fortynnet ti (pre-Tx og t<sub>0</sub>-prøver) eller fem (t<sub>1,5</sub>-prøver) ganger i medium med 0,5 % BSA. Det ble laget en løsning med antistoffkoblede kuler ved å fortynne ti ganger i Bio-Plex assaybuffer. Røret ble tildekket med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys og vortexet i 10 sekunder.

Et volum på 100 µL Bio-Plex assaybuffer ble tilsatt alle brønnene i filterplaten, som deretter ble filtrert på vakuumpumpe. Femti µL kulesuspensjon ble tilsatt hver brønn og filtrert. Filteret ble vasket to ganger ved å tilsette 100 µL vaskebuffer og så filtrere. Femti µL standardløsning (to paralleller av hver standard), kontroller og prøver ble overført til aktuelle brønner. Filterplaten ble forseglet med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister med lokk ved 300 rpm i 30 minutter.

Etter inkubering med antistoffkoblede kuler ble standarder, kontroller og prøver filtrert på vakuumpumpe, og filteret ble vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer. Løsning med deteksjonsantistoffer ble tillaget ved å fortynne ti ganger i deteksjonsantistoffdiluent, og røret ble vortexet i 10 sekunder. Et volum på 25 µL løsning med deteksjonsantistoffer ble tilsatt hver brønn. Filterplaten ble forseglet med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister med lokk ved 300 rpm i 30 minutter.

Platen ble deretter filtrert og vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer i hver brønn. Løsning med streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) ble tillaget ved å fortynne 100 ganger i Bio-Plex assaybuffer, tildekket med lysbeskyttende aluminiumsfolie, og vortexet i 10 sekunder. Et volum på 50 µL SA-PE-løsning ble tilsatt hver brønn. Filterplaten ble forseglet med plast, dekket til med aluminiumsfolie og inkubert på platerister ved 300 rpm i 10 minutter.

Etter inkubering med SA-PE ble platen filtrert og vasket tre ganger med 100 µL vaskebuffer i hver brønn. Et volum på 125 µL Bio-Plex assaybuffer ble tilsatt hver brønn. Filterplaten ble forseglet med plast og satt på platerister ved 1100 rpm i 30 sekunder. Filterplaten ble satt i Bio-Plex-instrumentet og cytokinene ble detektert av en 'photomultiplier tube' med innstillingen "lav" for optimal sensitivitet. Den tilhørende programvaren Bio-Plex Manager™ ble brukt til å konstruere kalibreringskurver og beregne cytokinkonsentrasjonene (pg/mL).

Presisjon innen analyseserier er tidligere dokumentert for metoden for cytokinene IL-2, IL-6 og TNF- $\alpha$ . Cytokinene måles med VK < 11 % (58).

## 4.6 Undersøkelse av biomarkørers legemiddelselektivitet

Som en del av masteroppgaven ble biomarkørers legemiddelselektivitet undersøkt med blod fra friske frivillige. Hensikten var å vurdere hvordan de ulike immundempende legemidlene påvirker biomarkørene som ble målt hos nyretransplanterte, og å vurdere mulige sammenhenger mellom de ulike biomarkørene.

For analyse av metabolsk aktivitet ble PBMC isolert fra fullblod uten tilsatt legemiddel. Det ble laget legemiddelresponskurver med metabolsk aktivitet som markør, og metabolsk aktivitet ble i tillegg målt i paralleller med og uten *ex vivo*-stimulering for å beregne aktiveringsgrad.

For analyse av IMPDH-aktivitet, purinbaser og cytokiner ble legemidler løst i metanol og tilsatt 2 mL heparinblod i henhold til tabell C (maksimum 5 µL metanol per 2 mL blod). Et tilsvarende volum metanol ble tilsatt kontrollene. MPA ble tilsatt både alene og i kombinasjon med de andre legemidlene for å detektere eventuelle additive eller synergistiske effekter. Blod tilsatt legemidler ble blandet og satt i vannbad i 30 minutter ved 37 °C for at legemidlene skulle fordeles i blodceller/plasma. Deretter ble fullblod inkubert med stimulanter for cytokinanalyse, og PBMC ble isolert og inkubert med og uten stimulanter for analyse av IMPDH-aktivitet og purinbaser (figur 6).

---

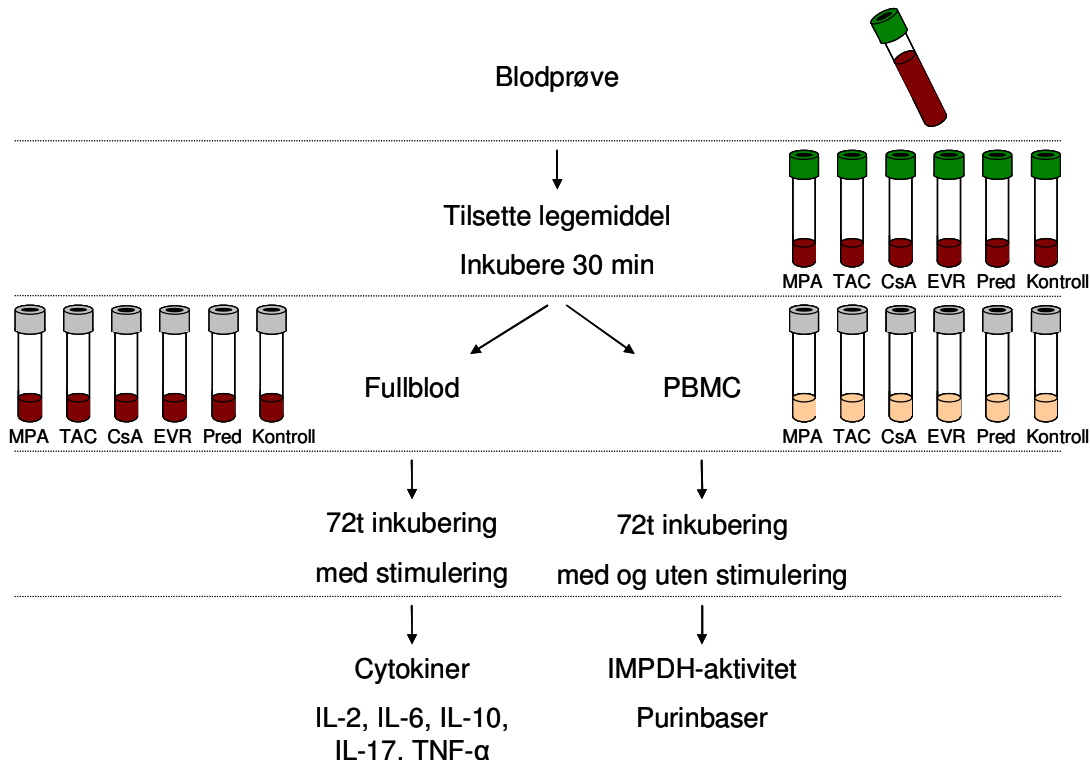
**Tabell C:** Legemiddelkonsentrasjoner brukt til undersøkelse av biomarkørers legemiddelselektivitet

---

Legemiddel	Sluttkonsentrasjon i blod
Mykofenolat	1 mg/L (tilsvarer ca. 2 mg/L i plasma)
Everolimus	10 µg/L
Takrolimus	8 µg/L
Ciklosporin A	150 µg/L
Prednisolon	45 µg/L (tilsvarer ca. 90 µg/L i plasma)

---





**Figur 6:** Prøveopparbeidelse for undersøkelse av legemiddelselektivitet for IMPDH-aktivitet, purinbaser og cytokiner i blodprøver fra friske personer. Fullblod ble pre-inkubert med mykofenolat (MPA), takrolimus (TAC), ciklosporin (CsA), everolimus (EVR), prednisolon (Pred) og metanol (kontroll). Fullblod ble så inkubert 72 timer med stimulering for analyse av cytokinene IL (interleukin)-2, IL-6, IL-10, IL-17 og TNF (tumor nekrosefaktor)- $\alpha$ . PBMC (mononukleære celler i perifert blod) ble isolert fra fullblod og inkubert i 72 timer med og uten stimulering for analyse av IMPDH-aktivitet og purinbaser.

## 4.7 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av SPSS 18.0. Wilcoxon signed-ranks test ble brukt til analyse av intraindividuelle endringer, og Mann-Whitney U-test ble brukt ved sammenligning av pasienter og friske. Spearman's test ble brukt for å undersøke om korrelasjon mellom biomarkører og legemiddelkonsentrasjon var statistisk signifikant. Statistisk signifikansnivå ble satt til  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTATER

### 5.1 Inklusjon og prøvetaking

#### 5.1.1 Friske personer

Det ble brukt blodprøver fra fem friske personer til undersøkelse av biomarkørers legemiddelselektivitet. Blant de frivillige var to menn og tre kvinner i alderen 26-58 år. Ingen av dem brukte immundempende legemidler. Biomarkører som ble målt var metabolsk aktivitet, IMPDH-aktivitet og purinbaser i både stimulerte og non-stimulerte PBMC, og cytokiner i stimulert fullblod.

#### 5.1.2 Nyretransplanterte

I løpet av våren 2012 ble det inkludert fem pasienter i studien av biomarkører hos nyretransplanterte. Ytterligere 12 pasienter ble inkludert under arbeidet med denne masteroppgaven, som ble utført fra august 2012 til mai 2013. Blant de til sammen 17 pasientene var det 13 menn og 4 kvinner i alderen 20-72 år. Den generelle immundempende behandlingen bestod av takrolimus, mykofenolat og prednisolon. Metylprednisolon og basiliximab ble gitt på operasjonsdagen, og basiliximab ble også gitt på dag 4 etter transplantasjon. To av pasientene var HLA-identiske med donor, og fulgte legemiddelregime uten MPA. Studien inkluderte en høyrisikopasient som fikk høyere takrolimus- og GK-doser.

Prøver ble tatt 0-2 dager før transplantasjon for 14 pasienter. Transplantasjonen ble utsatt for tre pasienter, men den opprinnelige pre-Tx-prøven ble likevel brukt. Prøver ble da tatt 9, 17 og 24 dager før transplantasjon. Noe av hensikten med pre-Tx-prøvene var å se på biomarkørene før pasientene begynte å bruke immundempende legemidler. Ved analyse av legemiddelkonsentrasjoner i blod/plasma ble det oppdaget at flere av pasientene hadde fått både takrolimus og MPA pre-Tx. I resultatene er pre-Tx-prøvene derfor delt i to grupper, immunsupprimerte og ikke-immunsupprimerte pasienter. I tillegg til pre-Tx ble det tatt blodprøver 6-9 dager, 5-7 uker og 1 år etter transplantasjon. Prøvene ble da tatt på morgenen like før dosering av immundempende legemidler ( $t_0$ ) og 1,5 time etter dosering ( $t_{1,5}$ ). Det ble tatt blodprøver av til sammen 16 pasienter 5-7 uker etter transplantasjon. Kun de fem pasientene som var inkludert våren 2012 ble tatt blodprøve av 1 år etter transplantasjon, og av

praktiske hensyn ble fire av disse 1-årsprøvene inkludert i denne oppgaven. Variasjoner i dagene det ble tatt prøver, skyldtes hovedsakelig praktiske årsaker, som pasientenes innkomstdag før transplantasjon, transplantasjonstidspunkt og analysemetodenes krav til 72 timer inkuberingstid.

## 5.2 Kliniske utfall

To pasienter gjennomgikk akutt avstøtningsepisode den første uken etter transplantasjon, og var under behandling for dette ved prøvetaking dag 6-9. Pasient 2 fikk cellulær avstøtning dag 4 postoperativt, og ble behandlet med høydose metylprednisolon og økt dose takrolimus. Protokollbiopsi ved 1 år viste at pasient 2 hadde en pågående subklinisk avstøtningsepisode. Pasient 8 fikk antistoffmediert avstøtning dag 3, og ble først behandlet med metylprednisolon. Metylprednisolon ble seponert dag 5, og pasienten fikk deretter antihuman thymocyt-kaninimmunoglobulin (ATG) dag 5 og 10. Takrolimusdoser var halvert ved dag 6-9 hos denne pasienten.

Tre pasienter har hittil opplevd viremi i løpet av studieforløpet. Pasient 3 fikk påvist polyoma BK-virus rundt 10 uker etter transplantasjon, og fikk deretter redusert takrolimus- og MPA-doser. Samme pasient fikk ved 16 uker påvist leukopeni, med hvite blodceller på  $1,6 \times 10^9/L$  (referanseområde  $4,0-11,0 \times 10^9/L$ ). Pasient 11 fikk rundt uke 10 påvist både polyoma BK- og John Cunningham(JC)-virus i blod, og MPA-dose ble redusert. Pasient 16 hadde tidligere fått behandling for mistenkt avstøtningsepisode, og fikk rundt 5-7-ukersprøven påvist moderate mengder av cytomegalovirus (CMV) i blod. Dette ble behandlet med valganciklovir. Pasienten var CMV-positiv før transplantasjon.

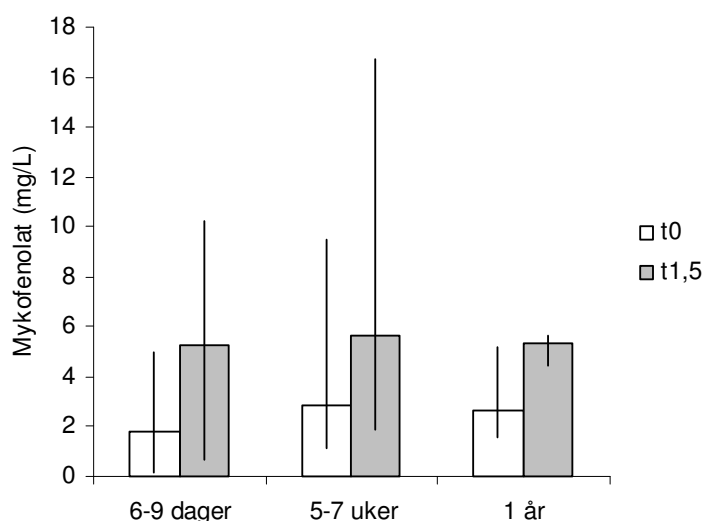
Flere kliniske endepunkter, som for eksempel leukopeni og nyrefunksjon, vil tas med i dataanalyser når alle pasientene har fullført studien.

## 5.3 Farmakokinetikk

### 5.3.1 Plasmakonsentrasjon av mykofenolat

To av de 17 pasientene var HLA-identiske og fikk legemiddelregime uten MPA, disse to utelukkes her. Seks av de 15 resterende pasientene hadde fått MPA før transplantasjon (målt til 0,75-16,5 mg/L i pre-Tx-prøve). Dag 6-9 var median  $C_0$  1,8 mg/L (0,2-5,0 mg/L, n=15), og

åtte pasienter hadde  $C_0 < 1,9$  mg/L, som har blitt anbefalt som minimumsnivå for nyretransplanterte i en konsensusrapport (37). De to pasientene som gjennomgikk antireksjonsbehandling ved dag 6-9 ble målt til 1,8 mg/L (pasient 2) og 0,2 mg/L (pasient 8). Ved uke 5-7 var medianverdien for  $C_0$  2,9 mg/L (1,2-9,5 mg/L, n=14). Tre pasienter hadde  $C_0 < 1,9$  mg/L, og fire pasienter hadde  $C_0 > 3,5$  mg/L. Pasient 8 hadde  $C_0$  1,2 mg/L. De to pasientene som fikk påvist polyomavirus rundt uke 10 hadde  $C_0$  2,7 og 3,0 mg/L ved uke 5-7. Pasienten med CMV-infeksjon hadde  $C_0$  1,2 mg/L ved uke 5-7. Pasienten med biopsiverifisert subklinisk avstøtning ved 1 år ble sammenfallende i tid målt til  $C_0$  2,6 mg/L. Konsentrasjonsnivåene for MPA er oppsummert i figur 7.

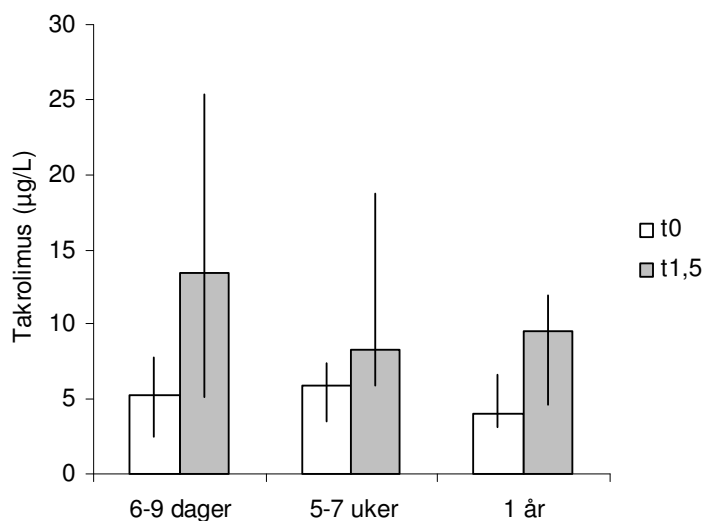


**Figur 7:** Plasmakonsentrasjon av mykofenolat (mg/L) hos nyretransplanterte pasienter målt 6-9 dager (n=15), 5-7 uker (n=14) og 1 år (n=3) etter transplantasjon ved  $t_0$  (rett før inntak av legemiddeldose) og  $t_{1,5}$  (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). Median (min-maks).

### 5.3.2 Blodkonsentrasjon av takrolimus

Fire av de 17 pasientene hadde fått takrolimus før transplantasjon (målt til 11-44  $\mu\text{g/L}$  i pre-Tx-prøve). Én pasient var klassifisert som høyrisikopasient og fikk forhøyede takrolimusdoser, denne pasienten utelukkes her. Dag 6-9 var  $C_0$  median 5,3  $\mu\text{g/L}$  (2,5-7,8  $\mu\text{g/L}$ , n=16). Én pasient var under terapeutisk område, som er 3-7  $\mu\text{g/L}$ , men pasienten hadde fått halvert takrolimusdosen grunnet pågående behandling med ATG. Den andre pasienten som fikk antireksjonsbehandling hadde  $C_0$  5,3  $\mu\text{g/L}$  ved dag 6-9. Ved 5-7 uker var medianverdien for  $C_0$  6,0  $\mu\text{g/L}$  (3,5-7,4  $\mu\text{g/L}$ , n=15). De to pasientene som fikk påvist polyomavirus hadde  $C_0$  7,4 og 4,3  $\mu\text{g/L}$  ved uke 5-7. Pasienten med CMV-infeksjon hadde  $C_0$  5,8  $\mu\text{g/L}$  ved uke 5-7. Pasienten med biopsiverifisert subklinisk avstøtning ved 1 år ble

sammenfallende i tid målt til  $C_0$  4,0  $\mu\text{g/L}$ . Konsentrasjonsnivåene for takrolimus er oppsummert i figur 8.



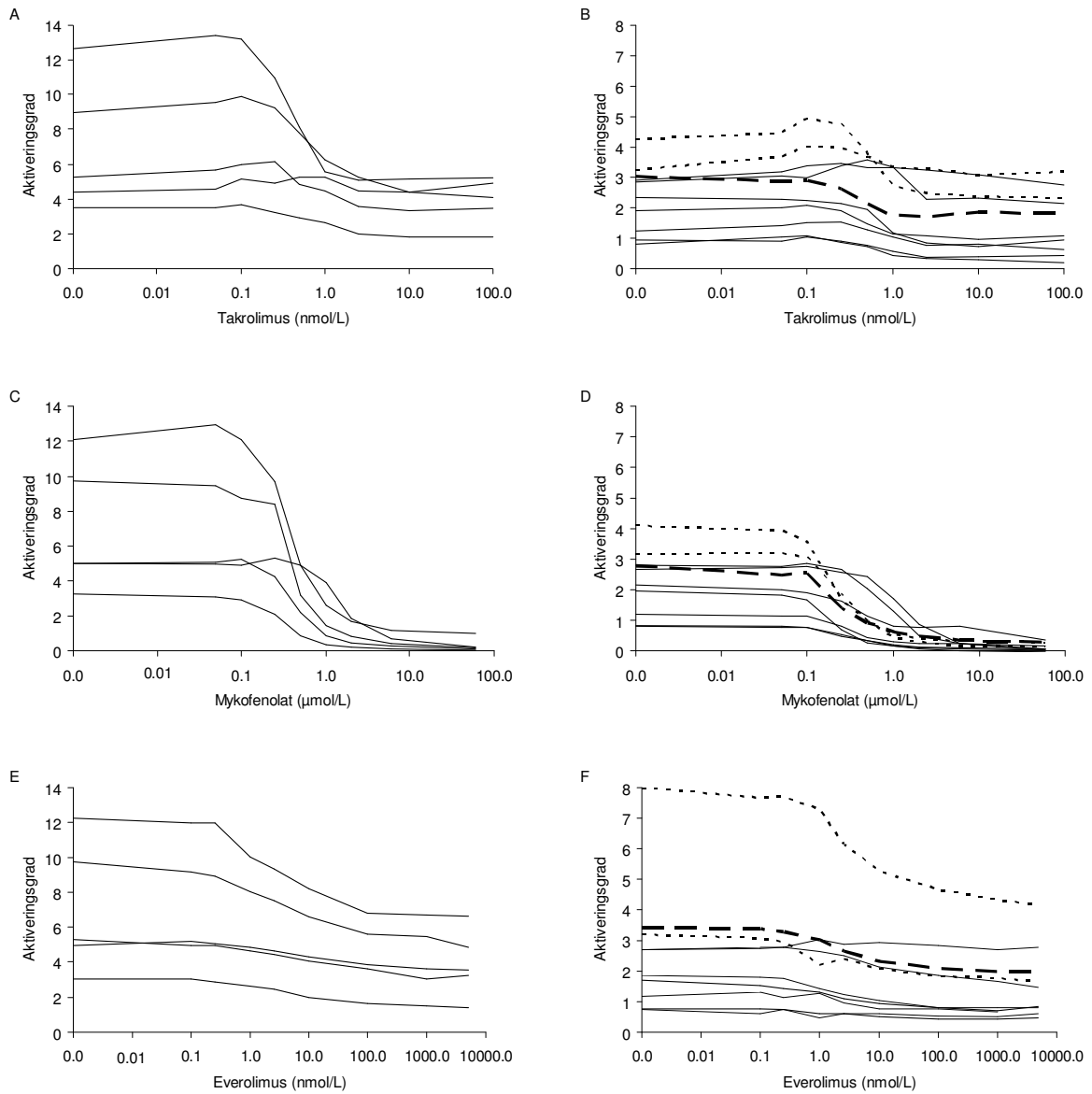
**Figur 8:** Blodkonsentrasjon av takrolimus ( $\mu\text{g/L}$ ) hos nyretransplanterte pasienter målt 6-9 dager ( $n=16$ ), 5-7 uker ( $n=15$ ) og 1 år ( $n=3$ ) etter transplantasjon ved  $t_0$  (rett før inntak av legemiddeldose) og  $t_{1,5}$  (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). Median (min-maks).

## 5.4 Metabolsk aktivitet som biomarkør

### 5.4.1 Legemiddelrespons målt før transplantasjon

Metabolsk aktivitet, målt ved hjelp av WST-1, ble brukt som en generell responsmarkør for å undersøke både friske personers og nyretransplanterte pasienters sensitivitet for takrolimus, MPA og everolimus. Aktiveringsgrad ble beregnet som ratio mellom absorbans i stimulerete PBMC i forhold til non-stimulerete PBMC.

Det ble konstruert legemiddelresponskurver fra blodprøver tatt av fem friske personer og fra blodprøver tatt av ti pasienter pre-Tx (figur 9). Hos de øvrige pasientene ble det målt konsentrasjoner av takrolimus og/eller mykofenolat i blod/plasma, deriblant én avstøtningspasient og én viremipasient. Responskurver fra disse pasientene er ekskludert, siden pasientene allerede var immunsupprimerte.



**Figur 9:** Immundempende legemidlers effekt på aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske personer (A, C, E) og fra ti pasienter før nyretransplantasjon (B, D, F). Grovstiplet linje er pasient 2, som hadde avstøtningsepisode, og finstiplede linjer er pasient 3 og 16, som hadde viremiepisoder. PBMC ble stimulert og inkubert med ulike konsentrasjoner av hvert immundempende legemiddel: A) og B) Takrolimus, C) og D) Mykofenolat, E) og F) Everolimus. WST-1 ble tilsatt etter 68 timers inkubering og prøvene ble videre inkubert i 4 timer. Responskurvene er basert på observerte målinger. N=1 per legemiddelkonsentrasjon.

Flertallet av de friske personene hadde høyere aktiveringsgrad enn de nyretransplanterte pasientene. Aktiveringsgraden ble redusert ved økende legemiddelkonsentrasjoner, men for everolimus var reduksjonen mye mindre enn for takrolimus og MPA. MPA gav den sterkeste hemmingen av aktiveringsgraden.

Viremipasientene hadde høy aktiveringsgrad i forhold til de andre pasientene, og avstøtningspasienten (pasient 2) var også i øvre sjikt av aktiveringsgrad. De hadde relativt god respons på alle tre legemidler.

For hvert legemiddel ble aktiveringsgrad,  $IC_{50}$ , maksimal inhibering (%) og minimumsnivå estimert ved nonlineær regresjonsanalyse.  $AUC_r$  ble beregnet ved hjelp av trapesmetoden. Responsvariabler for fem friske og ti pasienter er oppsummert i tabell D. Friske hadde litt høyere medianverdier enn pasienter for alle variablene. MPA gav generelt mindre interindividuelle forskjeller for variablene enn de andre legemidlene. MPA hadde svært høy maksimal inhibering (75-99 %). I tillegg var MPAs minimumsnivå for alle bortsett fra én person under 1,0. Stimulerte celler tilsatt høye konsentrasjoner av MPA hadde altså lavere metabolsk aktivitet enn non-stimulerte celler u/MPA. Takrolimus hadde noe lavere maksimal inhibering (15-71 %) og høyere minimumsnivåer enn MPA. Everolimus hadde enda lavere maksimal inhibering (7,1-58 %), men minimumsnivå mellom takrolimus og everolimus. MPA hadde lavest  $AUC_r$  av de tre legemidlene, takrolimus hadde noe høyere og everolimus hadde svært høy  $AUC_r$  i forhold til de andre legemidlene.

Både avstøtningspasienten og viremipasientene hadde estimert aktiveringsgrad som var høyere enn medianverdien med hensyn til de tre legemidlenes responskurver.

Viremipasientene hadde også estimert minimumsnivå som var høyere enn medianverdien med hensyn til de tre legemidlenes responskurver. Pasient 16 (CMV) hadde 14,8 % maksimal inhibering ved takrolimus, som var den svakeste inhiberingen hos alle pasientene. Pasient 3 (viremipasient) hadde høyest aktiveringsgrad (7,9) og  $AUC_r$  (21550) av alle basert på everolimus-responskurvene.

**Tabell D:** Variabler som beskriver *ex vivo*-immunaktivering og inhibitorisk respons

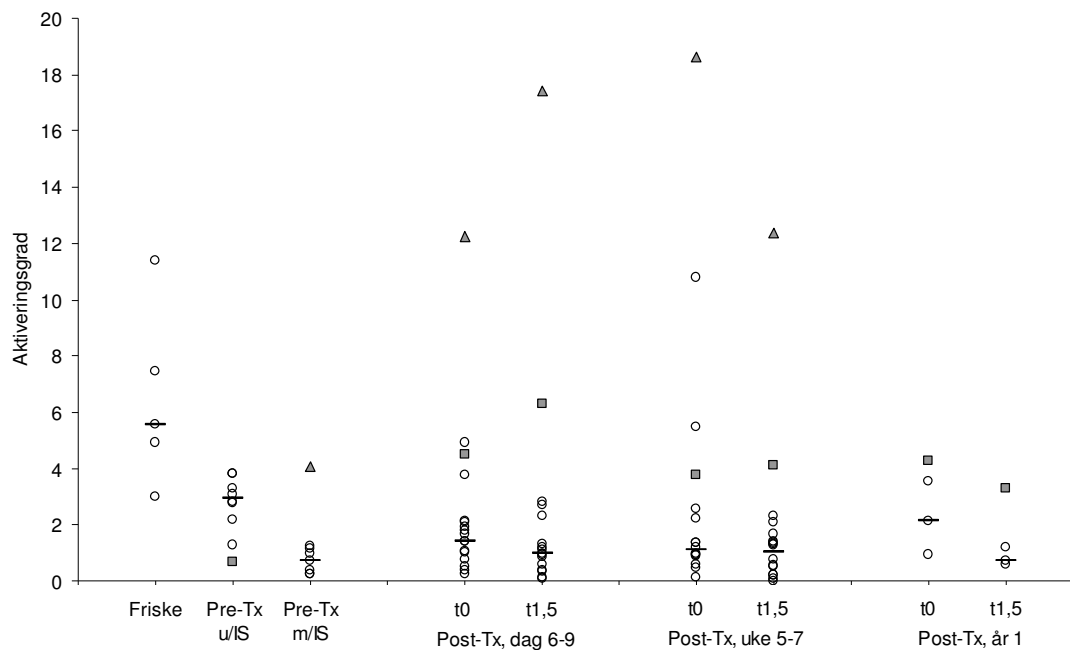
	Aktiveringsgrad	IC <sub>50</sub>	Maksimal inhibering (%)	Minimumsnivå	AUC <sub>r</sub>
Takrolimus Friske (n = 5)	5,7 (3,6-13,1)	0,8 (0,4-6,6)	50 (16-61)	4,1 (1,8-5,1)	427 (184-523)
Takrolimus Pasienter (n = 10)	2,6 (0,9-4,6)	0,7 (0,4-13,6)	48 (15-71)	1,4 (0,3-3,2)	143 (27-314)
Mykofenolat Friske (n = 5)	5,1 (3,2-12,5)	0,4 (0,3-1,5)	94 (90-97)	0,4 (0,1-1,3)	25 (6,7-72)
Mykofenolat Pasienter (n = 10)	2,5 (0,8-4,1)	0,3 (0,2-1,3)	92 (75-99)	0,2 (0,03-0,6)	13 (0,9-37)
Everolimus Friske (n = 5)	5,3 (3,1-12,4)	4,0 (2,1-9,6)	46 (30-52)	3,6 (1,5-6,7)	18200 (7500- 33650)
Everolimus Pasienter (n = 10)	2,4 (0,7-7,9)	1,6 (0,4-16,5*)	44 (7,1-58)	1,2 (0,04-4,3)	6500 (2250- 21550)

Målingene ble utført i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske personer og ti pasienter 0-4 dager før nyretransplantasjon. Aktiveringsgrad, IC<sub>50</sub> (takrolimus nmol/L, mykofenolat µmol/L, everolimus nmol/L), maksimum inhibering og minimumsnivå ble estimert for hvert legemiddel ved nonlinear regresjonsanalyse (4 parameters ligning, GraFit versjon 5). Trapesmetoden ble benyttet til beregning av AUC<sub>r</sub> (areal under responskurve) basert på faktiske målinger. Median (min-maks). \*Én pasient hadde tilnærmet ingen hemming av metabolsk aktivitet ved tilsetning av everolimus, IC<sub>50</sub> var da 2580 nmol/L.



## 5.4.2 Aktiveringsgrad målt før og etter transplantasjon

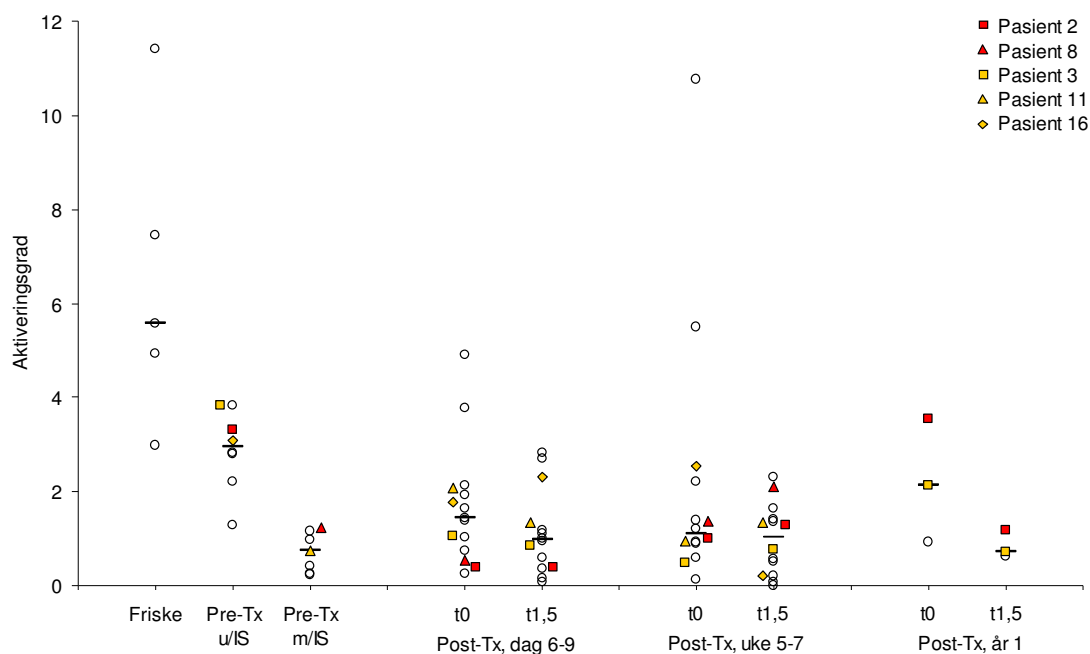
Aktiveringsgrad ble beregnet hos friske personer og hos pasienter ved alle prøvetidspunkter både før og etter transplantasjon (figur 10). I dette tilfellet ble aktiveringsgraden kalkulert som ratio mellom observert metabolsk aktivitet i stimulerte og non-stimulerte PBMC, og altså ikke estimert ut fra regresjon av responskurver. Ut fra medianverdiene hadde friske personer 2,0 ganger høyere aktiveringsgrad enn de ni pasientene som ikke hadde fått immundempende legemidler ved pre-Tx-prøvetidspunkt ( $P < 0,05$ ). De to pasientene som ikke brukte MPA hadde generelt høyere aktiveringsgrad post-Tx enn pasienter som brukte MPA. De åtte pasientene som ikke hadde fått immundempende legemidler pre-Tx og som fikk MPA post-Tx, fikk reduksjon i aktiveringsgraden fra median 3,0 pre-Tx til median 1,0 ved  $t_0$  både dag 6-9 og uke 5-7 ( $P < 0,05$ ). Medianverdien gikk ned med 36 % fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  ved dag 6-9 ( $n = 17$ ), men forskjellen var ikke signifikant. Ved uke 5-7 var medianverdien av aktiveringsgraden tilsvarende ved  $t_0$  og  $t_{1,5}$  ( $n=16$ ). Ved omtrent halvparten av målingene økte aktiveringsgraden fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ .



**Figur 10:** Aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske og 17 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten ( $n=9$ ) og med ( $n=8$ ) immunsuppressive legemidler (IS), avhengig av om det ble målt takrolimus og/eller mykofenolat i blod/plasma. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager ( $n=17$ ), 5-7 uker ( $n=16$ ) og 1 år ( $n=4$ ) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved  $t_0$  (rett før inntak av legemiddeldose) og  $t_{1,5}$  (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). To pasienter brukte ikke mykofenolat post-Tx, disse er merket med grått. Medianverdier basert på pasienter som brukte mykofenolat, er merket med strek. Aktiveringsgrad er beregnet som ratio mellom metabolsk aktivitet i stimulerte og non-stimulerte celler.

Ved dag 6-9 post-Tx hadde to pasienter akutte avstøtningsepisoder, og var under behandling for dette. Aktiveringsgraden til de to pasientene var svært lav ved dag 6-9 post-Tx (figur 11). Ved 1 år post-Tx ble det påvist subklinisk avstøtningsepisode ved biopsi hos én av disse to pasientene. Det ble observert høyere aktiveringsgrad hos denne pasienten sammenlignet med de andre (n = 2) ved 1-årsprøven. Aktiveringsgraden var 3,5 (t<sub>0</sub>) og 1,2 (t<sub>1,5</sub>) hos pasienten med subklinisk avstøtning, og median aktiveringsgrad var 2,1 (t<sub>0</sub>) og 0,7 (t<sub>1,5</sub>). Den samme pasienten var også blant dem med høyere aktiveringsgrad (> median) pre-Tx.

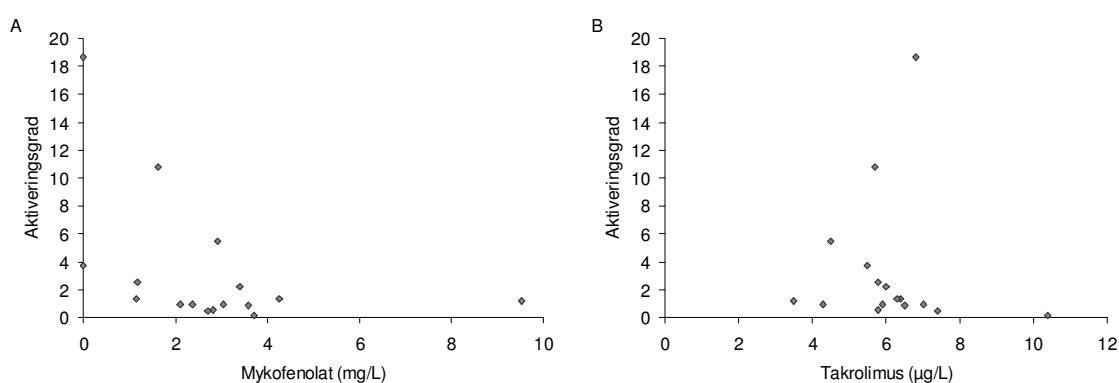
Tre av de 17 pasientene fikk viremi etter eller rundt uke 5-7. To av disse pasientene hadde forholdsvis høy aktiveringsgrad pre-Tx. Hos den ene pasienten med polyomaviremi (uke 10) var det en tendens til noe lav aktiveringsgrad (< median) sammenlignet med de andre pasientene. Pasient 16, som hadde CMV rundt uke 5-7, hadde 92 % hemming av aktiveringsgrad fra t<sub>0</sub> til t<sub>1,5</sub> ved dette prøvetidspunktet.



**Figur 11:** Aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske og 15 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=8) og med (n=7) immunosuppressive legemidler (IS), avhengig av om det ble målt takrolimus og/eller mykofenolat i blod/plasma. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=15), 5-7 uker (n=14) og 1 år (n=3) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). To pasienter brukte ikke mykofenolat post-Tx, disse er ekskludert fra figuren. To pasienter fikk avstøtningsepisode i løpet av studien, og er merket med rødt. Tre pasienter fikk viremi etter eller rundt uke 5-7, og er merket med gult. Medianverdiene er merket med strek. Aktiveringsgrad er beregnet som ratio mellom metabolsk aktivitet i stimulerte og non-stimulerte celler.

### 5.4.3 Aktiveringsgrad i forhold til legemiddelkonsentrasjoner

Det ble utført korrelasjonstest for aktiveringsgraden ved 5-7 uker (n=16) i forhold til plasmakonsentrasjoner av MPA og blodkonsentrasjoner av takrolimus (figur 12 viser  $t_0$ ). For MPA og aktiveringsgrad var det tegn til korrelasjon både ved  $t_0$  og  $t_{1,5}$  ( $P=0,06$  for begge). For takrolimus og aktiveringsgrad var det også antydning til korrelasjon ved  $t_0$ , men i mindre grad enn for mykofenolat ( $P=0,17$  ved  $t_0$  og  $P=0,95$  for  $t_{1,5}$ ). Den ene av pasientene som ikke fikk MPA er tydelig uteligger på plottet for takrolimus, med aktiveringsgrad på 19 og takrolimuskonsentrasjon på  $6,8 \mu\text{g/L}$ .



**Figur 12:** Aktiveringsgrad i PBMC (mononukleære celler i perifert blod) i forhold til A) plasmakonsentrasjon av mykofenolat og B) blodkonsentrasjon av takrolimus ved uke 5-7  $t_0$ . (N=16).

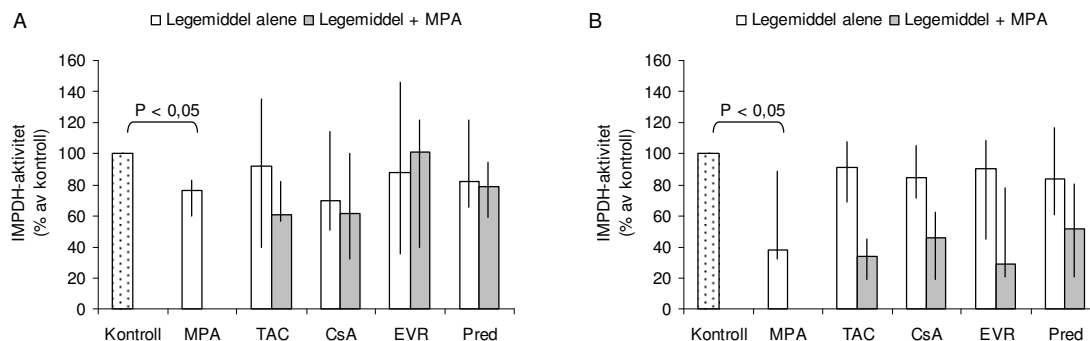
## 5.5 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører

### 5.5.1 Legemiddelselektivitet hos friske

Fullblod fra fem friske personer ble pre-inkubert 30 minutter med MPA  $1,0 \text{ mg/L}$  (fullblod), takrolimus  $8 \mu\text{g/L}$ , CsA  $150 \mu\text{g/L}$ , everolimus  $10 \mu\text{g/L}$  og prednisolon  $45 \mu\text{g/L}$  (fullblod) før PBMC ble isolert. IMPDH-aktivitet og purinbaser ble analysert i non-stimulerte og stimulerte celler. MPA ble tilsatt både alene og i kombinasjon med de andre legemidlene for å se om det var additive effekter.

IMPDH-aktiviteten i stimulerte kontrollen (uten legemiddel) var median 40 ganger høyere enn i non-stimulerte kontrollen hos de fem friske. MPA gav median 62 % hemming av IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC og median 24 % hemming i non-stimulerte PBMC i forhold til kontroll ( $P<0,05$  for begge) (figur 13). Ved tilsetning av MPA var det median 2,6 ganger sterkere IMPDH-hemming i stimulerte celler enn i non-stimulerte celler. Ingen av de andre

legemidlene (ved aktuelle konsentrasjoner) gav signifikant hemming av IMPDH-aktivitet verken i stimulerede eller non-stimulerede celler. Det var heller ikke signifikant additiv hemming av takrolimus, CsA, everolimus eller prednisolon sammen med MPA i forhold til MPA alene.

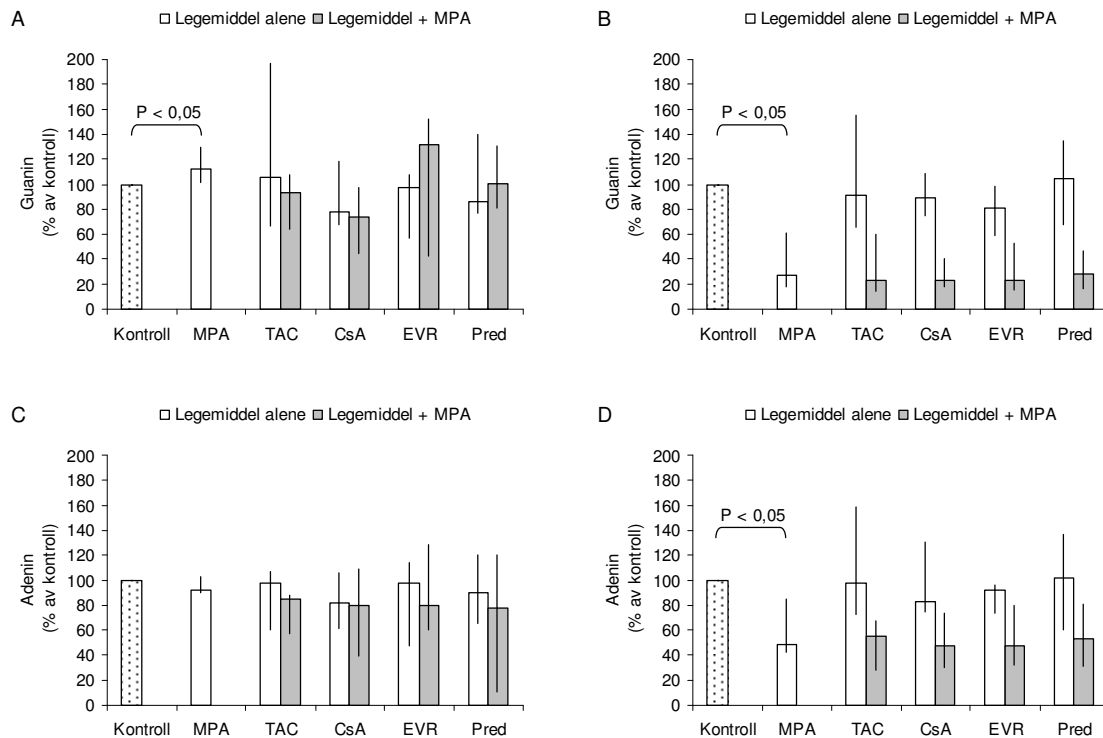


**Figur 13:** IMPDH (inosin monofosfat dehydrogenase)-aktivitet målt i A) non-stimulerede og B) stimulerede PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske personer. PBMC ble isolert fra blod inkubert med legemidlene mykofenolat (MPA, 1,0 mg/L), takrolimus (TAC, 8 µg/L), ciklosporin (CsA, 150 µg/L), everolimus (EVR, 10 µg/L) og prednisolon (Pred, 45 µg/L) alene (hvite søyler) og i kombinasjon med MPA (grå søyler). Cellene ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering. Gjennomsnittet av tre kontroller uten legemiddeltilsetning ble satt til 100 %, og IMPDH-aktiviteten i de andre prøvene ble beregnet i forhold til dette gjennomsnittet, angitt som % av kontroll. Median (min-maks), n=5.

MPA gav median 12 % økning av guanin i non-stimulerede PBMC ( $P < 0,05$ ) (figur 14). CsA i kombinasjon med MPA gav 35 % reduksjon av guanin i forhold til MPA alene ( $P < 0,05$ ) og 22 % reduksjon i forhold til kontroll. Ingen av de andre legemidlene gav signifikant endring verken alene eller i kombinasjon med MPA. Til sammen var 24 % av prøvene i non-stimulerede celler under analysemetodens validerte måleområde, og for noen av legemidlene varierte resultatene i stor grad mellom personer.

Det ble observert median 8,3 ganger høyere guaninverdier i stimulerede PBMC i forhold til non-stimulerede. I stimulerede PBMC gav MPA median 73 % reduksjon av guanin ( $P < 0,05$ ), og everolimus gav median 20 % reduksjon av guanin ( $P < 0,05$ ).

I non-stimulerede PBMC ble det observert mindre grad av endringer for adenin enn for guanin. Her var 10 % av prøvene under analysemetodens validerte måleområde. Det var median 3,4 ganger høyere adeninnivåer i stimulerede PBMC i forhold til non-stimulerede. MPA gav median 51 % reduksjon av adenin i stimulerede PBMC ( $P < 0,05$ ) og everolimus gav median 6,3 % reduksjon ( $P < 0,05$ ). Ingen av legemidlene gav signifikant additiv effekt til MPA i stimulerede PBMC.



**Figur 14:** Guanin målt i A) non-stimulerte og B) stimulerede PBMC (mononukleære celler i perifert blod) og adenin målt i C) non-stimulerte og D) stimulerede PBMC fra fem friske personer. PBMC ble isolert fra blod inkubert med legemidlene mykofenolat (MPA, 1,0 mg/L), takrolimus (TAC, 8 µg/L), ciklosporin (CsA, 150 µg/L), everolimus (EVR, 10 µg/L) og prednisolon (Pred, 45 µg/L) alene (hvite søyler) og i kombinasjon med MPA (grå søyler). Cellene ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering. Gjennomsnittet av tre kontroller uten legemiddeltisetning ble satt til 100 %, og nivåene i de andre prøvene ble beregnet i forhold til dette gjennomsnittet, angitt som % av kontroll. Median (min-maks), n=5.

Ved analyse av hypoxantin var 10 % av prøvene i stimulerede PBMC og 70 % av prøvene i non-stimulerede PBMC under analysemetodens validerte måleområde. Disse resultatene inneholdt store variasjoner, og blir derfor ikke vist her.

### 5.5.2 IMPDH-aktivitet målt før og etter nyretransplantasjon

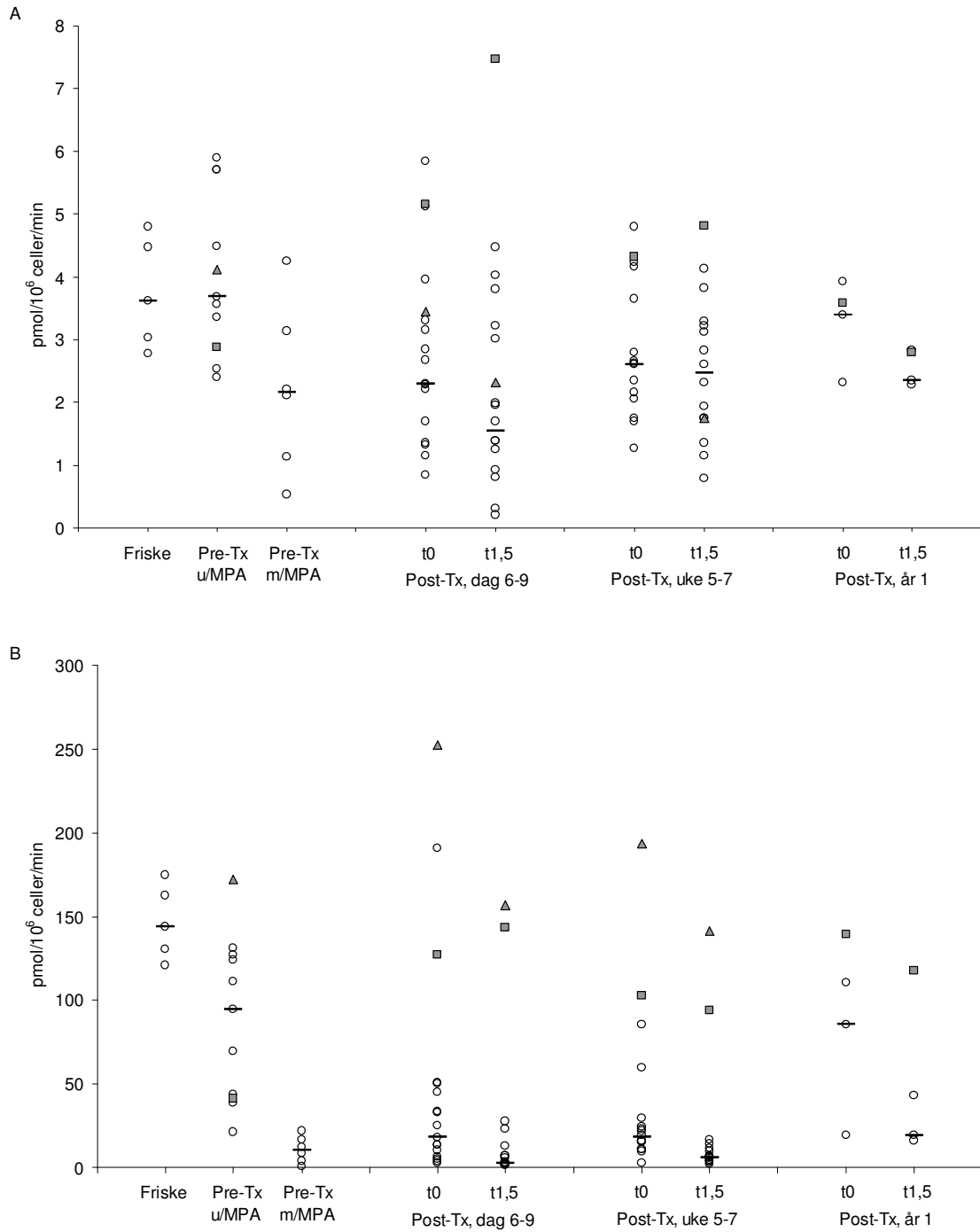
IMPDH-aktiviteten hos de 11 pasientene u/MPA pre-Tx (inkludert de to HLA-identiske u/MPA post-Tx) var median 22 ganger høyere i stimulerede PBMC enn i non-stimulerede. Hos pasienter m/MPA var IMPDH-aktiviteten ved t<sub>0</sub> dag 6-9, uke 5-7 og år 1 henholdsvis median 7,4, 6,3 og 22 ganger høyere i stimulerede vs non-stimulerede PBMC, og ved t<sub>1,5</sub> var den median 2,3, 2,8 og 8,5 ganger høyere. Hos den ene pasienten u/MPA post-Tx var IMPDH-aktiviteten ved t<sub>0</sub> dag 6-9, uke 5-7 og år 1 henholdsvis 25, 24 og 39 ganger høyere i stimulerede vs non-stimulerede PBMC, og ved t<sub>1,5</sub> var den 19, 19 og 42 ganger høyere. Hos den andre pasienten u/MPA post-Tx var IMPDH-aktiviteten ved t<sub>0</sub> dag 6-9 73 ganger høyere i stimulerede vs non-

stimulerte PBMC, og ved  $t_{1,5}$  dag 6-9 og uke 5-7 var den henholdsvis 68 og 81 ganger høyere. Medianverdier av den relative IMPDH-aktiviteten (ved  $t_{1,5}$  i % av  $t_0$ ) hos pasienter som brukte MPA var ved 6-9 dager, 5-7 uker og 1 år henholdsvis 75 (15-113) %, 67 (45-245) % og 83 (58-101) % i non-stimulerte celler og 23 (3,6-59) %, 35 (15-143) % og 39 (22-84) % i stimulerte celler.

IMPDH-aktiviteten hos friske og pasienter er oppsummert i figur 15. IMPDH-aktiviteten i non-stimulerte PBMC ble redusert fra pre-Tx u/MPA (n=9) til dag 6-9  $t_{1,5}$  og uke 5-7  $t_0$  og  $t_{1,5}$  med henholdsvis median 18 %, 30 % og 18 % ( $P<0,05$ ). Hos pasienter m/MPA post-Tx var det ingen signifikant reduksjon av IMPDH-aktivitet i non-stimulerte PBMC fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  verken dag 6-9 (n=15) eller uke 5-7 (n=14).

Det ble observert signifikant reduksjon av IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC fra pre-Tx u/MPA (n=9) til alle prøvetidspunkter post-Tx, bortsett fra 1 år hvor det var for få pasienter til å utføre statistiske analyser. Reduksjonen fra pre-Tx til dag 6-9  $t_0$  var 86 % og til uke 5-7  $t_0$  var den 80 % ( $P<0,05$ ). Hos pasienter m/MPA post-Tx ble IMPDH-aktiviteten redusert fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  med median 84 % for dag 6-9 ( $P<0,05$ , n=15) og median 66 % for uke 5-7 ( $P<0,05$ , n=14). Hos pasienter u/MPA post-Tx ble det med ett unntak observert redusert IMPDH-aktivitet fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  i stimulerte PBMC.

Basert på medianverdiene av IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC, var nivået hos de fem friske 53 % høyere sammenlignet med de 11 pasientene u/MPA pre-Tx ( $P<0,05$ ). I non-stimulerte PBMC var det ingen signifikant forskjell i IMPDH-aktivitet mellom friske og pasienter u/MPA pre-Tx.



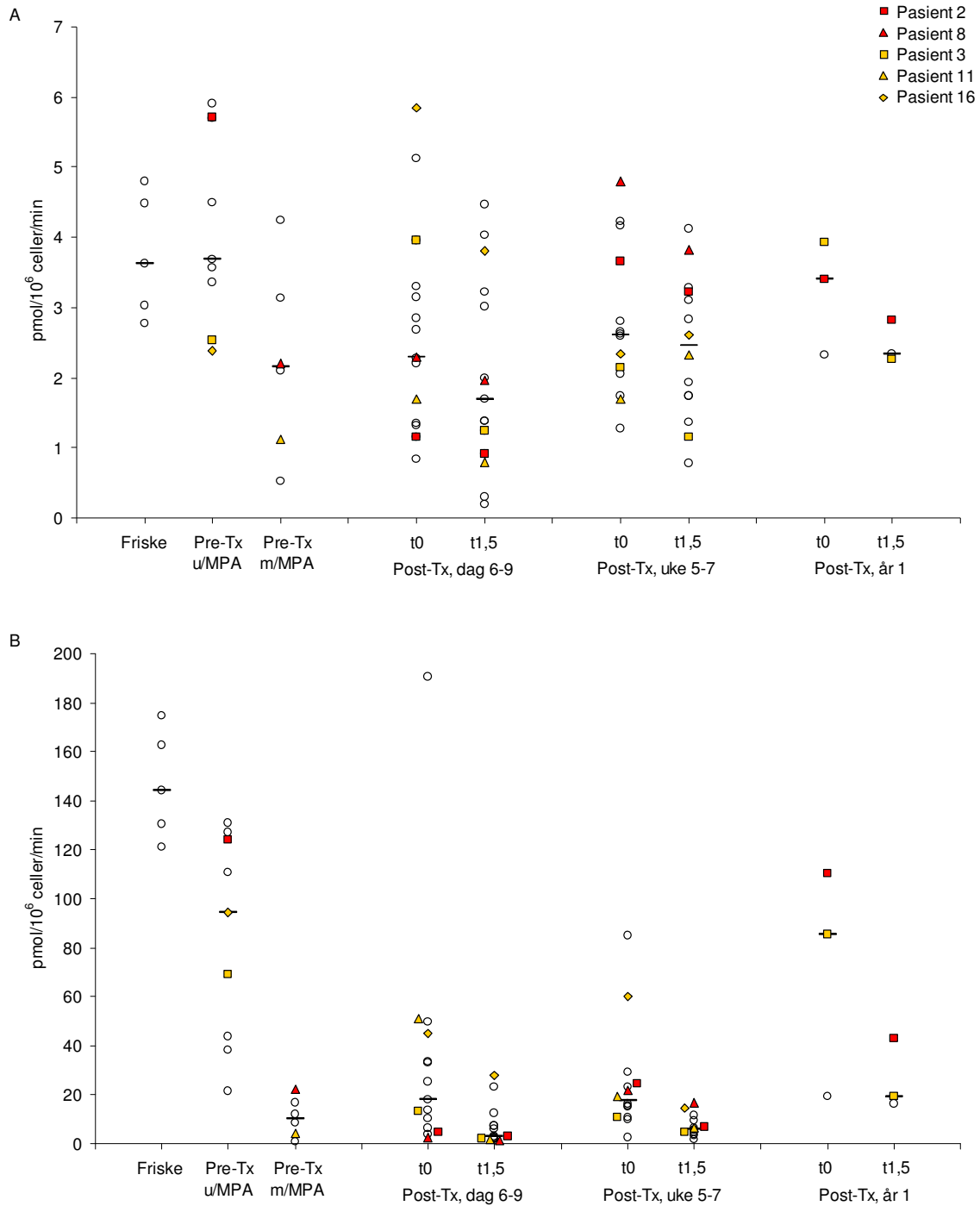
**Figur 15:** IMPDH (inosin monofosfat dehydrogenase)-aktivitet i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske og 17 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=11) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=17), 5-7 uker (n=16) og 1 år (n=4) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er merket med grått. Medianverdier er merket med strek. Post-Tx er median beregnet kun for pasienter som brukte MPA. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.

I non-stimulerte PBMC ble det observert lav IMPDH-aktivitet pre-Tx hos pasienter som fikk viremi under studien (figur 16). Post-Tx skilte ikke IMPDH-aktiviteten hos viremipasienter seg fra andre pasienter, bortsett fra noe lavere aktivitet ved  $t_0$  uke 5-7 i non-stimulerte celler.

Pasient 2, som hadde akutt avstøtning den første uken etter transplantasjon, hadde høy IMPDH-aktivitet pre-Tx både i non-stimulerte og stimulerte PBMC i forhold til de andre pasientene. Pasient 8 hadde høyest IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC av pasientene som hadde fått MPA pre-Tx, men pasienten hadde også lavest MPA-plasmakonsentrasjon av de seks (0,75 mg/L). Begge avstøtningspasientene hadde svært lav IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC ved dag 6-9, da de var under rejeksjonsbehandling. Pasient 2, som gjennomgikk subklinisk avstøtningsepisode ved 1-årskontrollen, hadde da høyest IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC av de tre pasientene m/MPA.

Én pasient skilte seg ut fra de andre ved å ha svært høy IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC ved  $t_0$  spesielt dag 6-9, men også uke 5-7. Ved dag 6-9 og uke 5-7 var MPA  $C_0$  henholdsvis 0,5 mg/L og 1,6 mg/L hos pasienten.

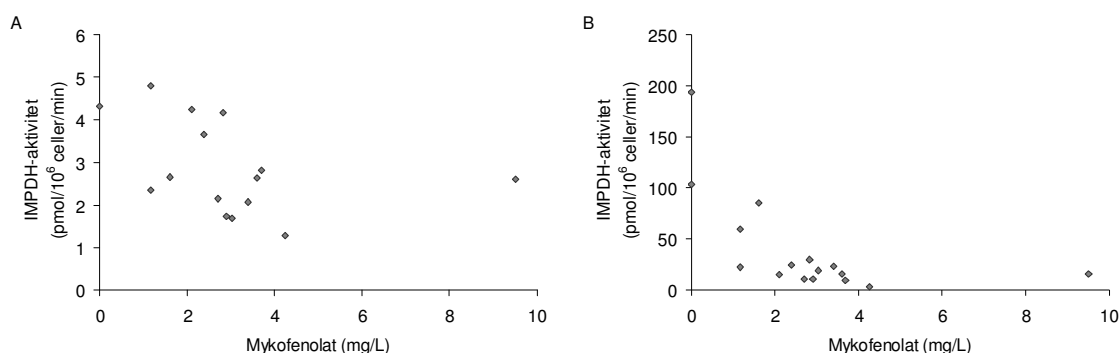




**Figur 16:** IMPDH (inosin monofosfat dehydrogenase)-aktivitet i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) hos fem friske og 15 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=9) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er ekskludert fra figuren. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=15), 5-7 uker (n=14) og 1 år (n=3) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). Medianverdier er merket med strek. Pasienter som fikk viremi etter eller rundt uke 5-7 er merket med gult (n=3), pasienter med avstøtning før dag 6-9 (n=2) og subklinisk avstøtning ved 1 år (n=1) er merket med rødt. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.

### 5.5.3 Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og mykofenolat hos nyretransplanterte

Det ble utført korrelasjonstest for IMPDH-aktivitet i forhold til plasmakonsentrasjoner av MPA ved de ulike prøvetidspunktene post-Tx (figur 17). Det var statistisk signifikant korrelasjon i stimulerede PBMC ved uke 5-7  $t_0$  ( $P=0,002$ ) og  $t_{1,5}$  ( $P=0,007$ ), med korrelasjonskoeffisienter på henholdsvis  $-0,72$  og  $-0,65$  ( $n=16$ ). Det var ikke signifikant korrelasjon i stimulerede PBMC ved dag 6-9, heller ikke i non-stimulerede PBMC ved noen av prøvetidspunktene (se appendix figur A1 for oversikt over alle prøvetidspunkter).



**Figur 17:** IMPDH-aktivitet i A) non-stimulerede og B) stimulerede PBMC (mononukleære celler i perifert blod) mot plasmakonsentrasjon av mykofenolat ved uke 5-7 før legemiddelintak ( $t_0$ ,  $n=16$ ). Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.

### 5.5.4 Purinbaser målt før og etter nyretransplantasjon

I non-stimulerede PBMC ble det observert 37 % lavere median guaninnivåer hos friske personer ( $n=5$ ) enn hos pasienter u/MPA pre-Tx ( $n=11$ ,  $P<0,05$ ). Det var ingen signifikant reduksjon av guanin i non-stimulerede PBMC fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  verken ved dag 6-9 ( $n=15$ ) eller uke 5-7 ( $n=14$ ). Guaninnivåene i non-stimulerede PBMC ble redusert fra pre-Tx u/MPA til dag 6-9  $t_{1,5}$  med 34 % ( $P<0,05$ ), men det var ikke signifikant reduksjon til de andre prøvetidspunktene post-Tx. Guaninnivåene hos friske og pasienter er oppsummert i figur 18.

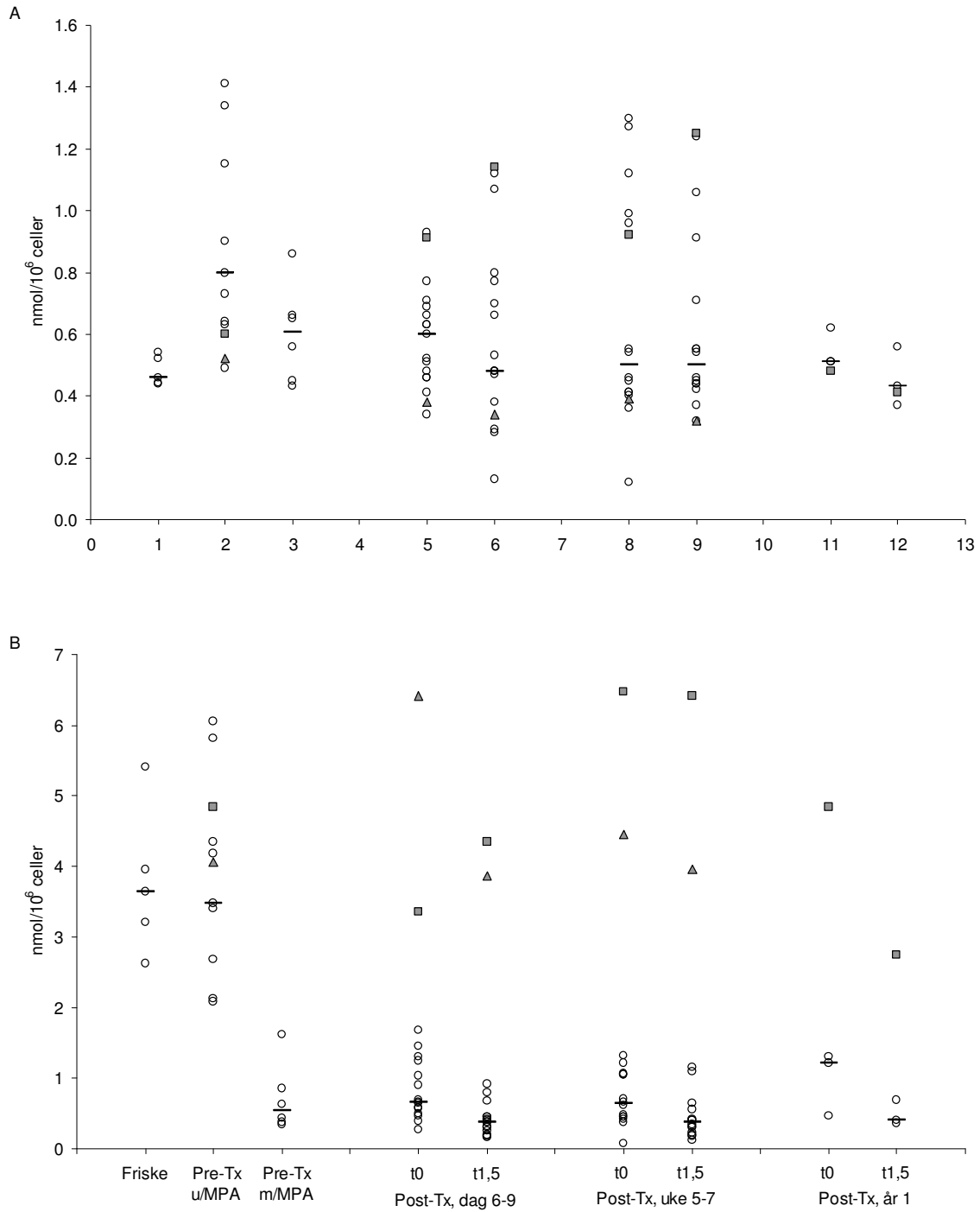
Guaninnivåene hos de 11 pasientene u/MPA pre-Tx (inkludert de to HLA-identiske) var median 5 ganger høyere i stimulerede PBMC enn i non-stimulerede. De to pasientene u/MPA post-Tx hadde tydelig høyere guaninnivåer i stimulerede PBMC enn pasienter m/MPA post-Tx.

I stimulerede PBMC var reduksjonen av guanin fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  44 % ved dag 6-9 ( $n=15$ ,  $P<0,05$ ) og 41 % ved uke 5-7 ( $n=14$ ,  $P<0,05$ ) hos pasienter m/MPA. Det ble observert statistisk

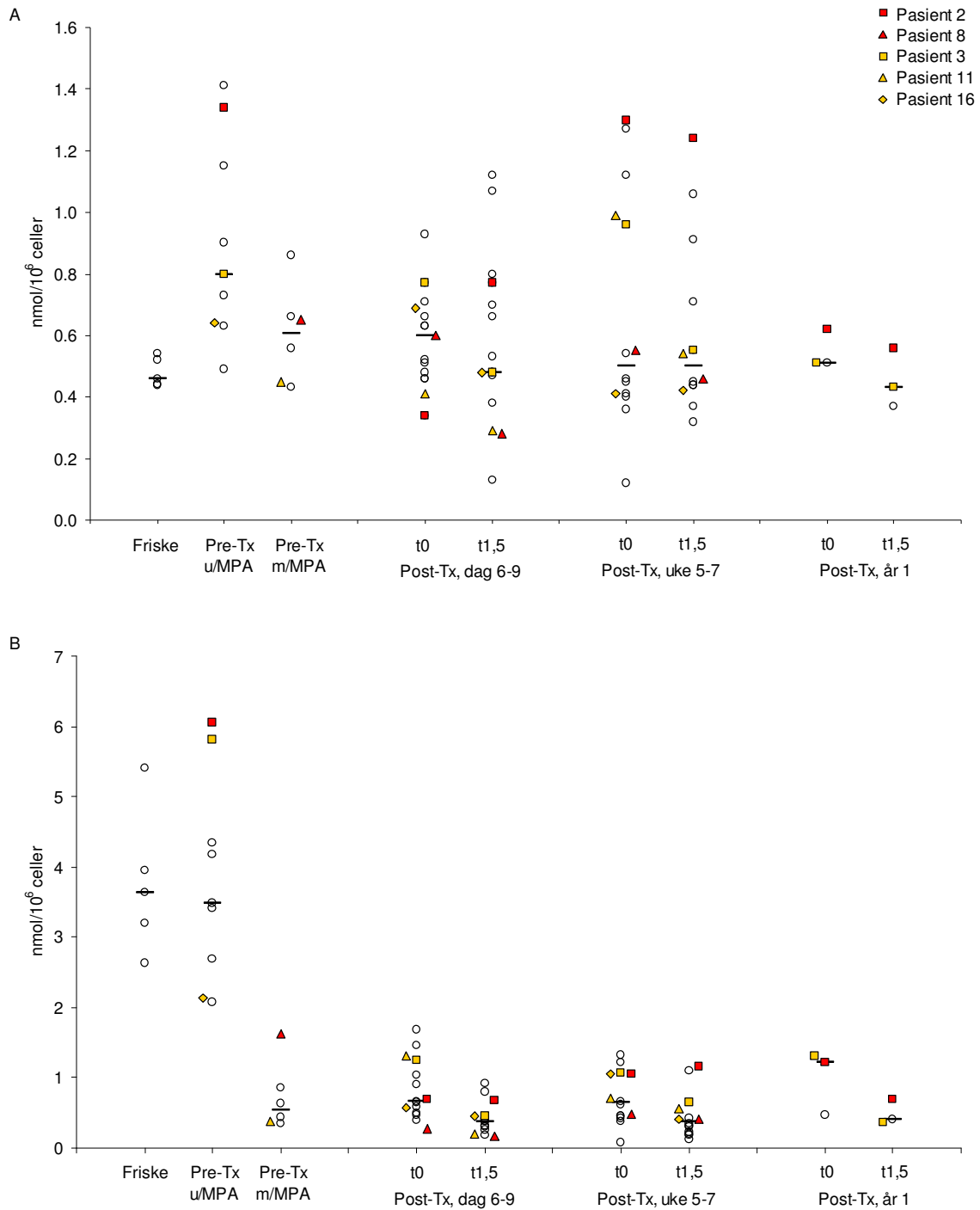
signifikant reduksjon fra pre-Tx u/MPA til alle prøvetidspunkter post-Tx bortsett fra 1 år, hvor det var for få pasienter til å utføre statistiske analyser. Reduksjonen av medianverdiene fra pre-Tx til dag 6-9 og uke 5-7  $t_0$  var henholdsvis 83 % og 75 % ( $P < 0,05$ ). Det var ingen signifikant forskjell mellom friske og pasienter u/MPA pre-Tx med hensyn til guanin i stimulerede PBMC pre-Tx.

Pasient 2, som hadde avstøtningsepisode første uke post-Tx og etter 1 år, hadde høye guaninnivåer i non-stimulerede PBMC ved alle prøvetidspunkter bortsett fra ved dag 6-9, da pasienten gjennomgikk rejeksjonsbehandling (figur 19). Pasient 16 hadde tendens til lave guaninnivåer ( $<$  median) i non-stimulerede PBMC pre-Tx og ved uke 5-7, da pasienten hadde forhøyede CMV-nivåer.

I stimulerede PBMC ble det også sett høye guaninnivåer hos pasient 2 og lave nivåer hos pasient 16 pre-Tx. Pasient 8, som også gjennomgikk avstøtningsepisode den første uken post-Tx, hadde høye guaninnivåer pre-Tx i forhold til andre pasienter m/MPA, men plasmakonsentrasjonen av MPA var kun 0,75 mg/L. Det ble i tillegg sett relativt høye guaninnivåer hos pasient 2 ved uke 5-7. Inntil 1-årsprøven ble det ikke sett reduksjon av guaninnivåer i stimulerede PBMC fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  hos pasient 2.



**Figur 18:** Guanin i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske og 17 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=11) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=17), 5-7 uker (n=16) og 1 år (n=4) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er merket med grått. Medianverdier er merket med strek. Post-Tx er median beregnet kun for pasienter som brukte MPA. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.



**Figur 19:** Guanin i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) hos fem friske og 15 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=9) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er ekskludert fra figuren. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=15), 5-7 uker (n=14) og 1 år (n=3) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). Medianverdier er merket med strek. Pasienter som fikk viremi etter eller rundt uke 5-7 er merket med gult (n=3), pasienter med avstøtning før dag 6-9 (n=2) og subklinisk avstøtning ved 1 år (n=1) er merket med rødt. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.

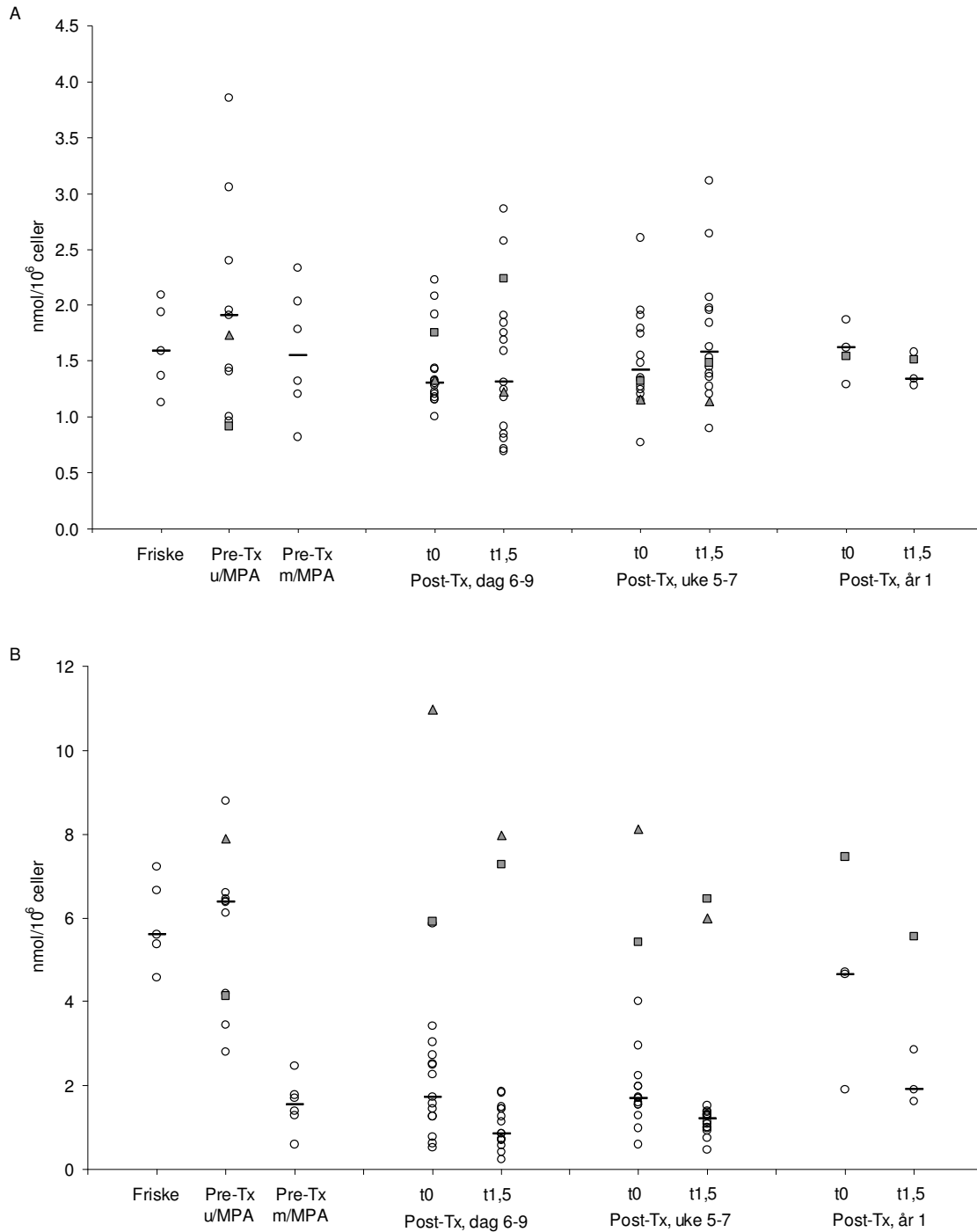
Det ble ikke observert noen betydelige endringer i adeninnivåene i non-stimulerte PBMC.

Adeninnivåene hos de til sammen 11 pasientene u/MPA pre-Tx var median 4 ganger høyere i stimulerte PBMC enn i non-stimulerte ved pre-Tx-prøvetidspunkt. I stimulerte PBMC hadde pasienter u/MPA post-Tx betydelig høyere adeninnivåer enn pasienter m/MPA post-Tx (figur 20).

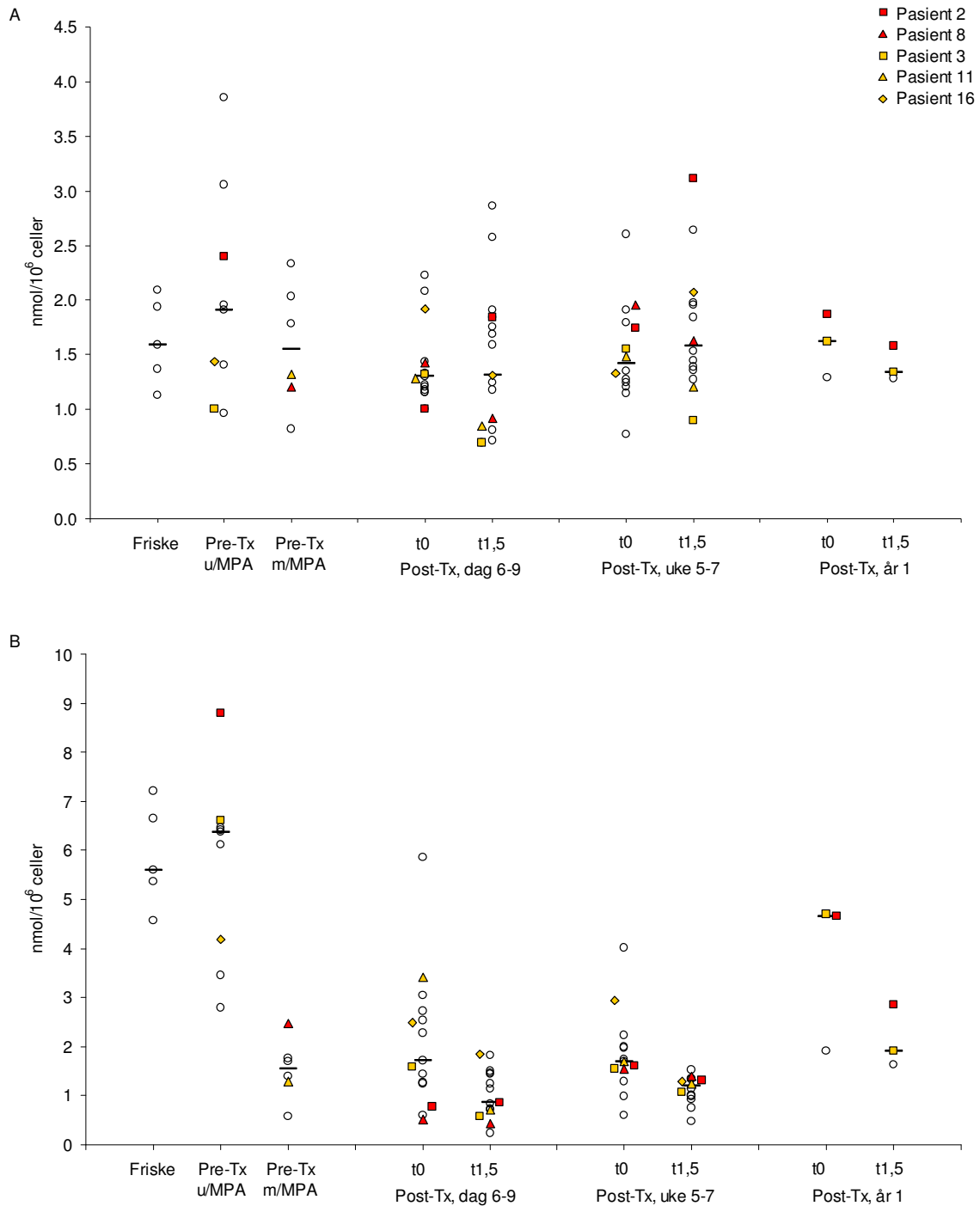
I stimulerte PBMC var reduksjonen fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  50 % ved dag 6-9 ( $n=15$ ,  $P<0,05$ ) og 29 % ved uke 5-7 ( $n=14$ ,  $P<0,05$ ) hos pasienter m/MPA. Det var signifikant reduksjon av adenin fra pre-Tx til alle prøvetidspunkter post-Tx for pasienter u/MPA pre-Tx ( $n=9$ ). Reduksjonen av medianverdiene fra pre-Tx til dag 6-9 og uke 5-7  $t_0$  var henholdsvis 78 % og 72 % ( $P<0,05$ ). Det var tendens til økning av adenin 1 år post-Tx i forhold til dag 6-9 og uke 5-7, men verdiene var ikke tilbake til pre-Tx-nivåer.

I non-stimulerte PBMC skilte ikke adeninnivået til pasient 2 (avstøtningspasient) seg markant ut pre-Tx (figur 21). Ved 1 år (subklinisk avstøtning) var adeninnivåene til pasient 2 høyest av de tre pasientene m/MPA. Pasient 3 og 16 hadde adeninnivåer i nedre sjikt pre-Tx, og fikk påvist viremi rundt eller etter uke 5-7.

I stimulerte PBMC hadde pasient 2 høyest adenin av alle pasienter pre-Tx, pasienten hadde også tendens til høye nivåer ved 1 år. Pasient 8 hadde høy adenin pre-Tx sammenlignet med resten av gruppen m/MPA. Pasient 16 hadde lav adenin i stimulerte PBMC pre-Tx, og sterk reduksjon av adenin fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  ved uke 5-7, da pasienten hadde forhøyede CMV-nivåer.



**Figur 20:** Adenin i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) fra fem friske og 17 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=11) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=17), 5-7 uker (n=16) og 1 år (n=4) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er merket med grått. Medianverdier er merket med strek. Post-Tx er median beregnet kun for pasienter som brukte MPA. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.



**Figur 21:** Adenin i A) non-stimulerte og B) stimulerte PBMC (mononukleære celler i perifert blod) hos fem friske og 15 pasienter før og etter nyretransplantasjon. Ved pre-Tx-prøvetidspunkt (før transplantasjon) ble pasientene delt i to grupper: uten (n=9) og med (n=6) mykofenolat (MPA), avhengig av om det ble målt MPA i plasma. To pasienter brukte ikke MPA post-Tx, disse er ekskludert fra figuren. Ved post-Tx-prøvetidspunktene 6-9 dager (n=15), 5-7 uker (n=14) og 1 år (n=3) etter transplantasjon ble blodprøver tatt ved t<sub>0</sub> (rett før inntak av legemiddeldose) og t<sub>1,5</sub> (1,5 time etter inntak av legemiddeldose). Medianverdier er merket med strek. Pasienter som fikk viremi etter eller rundt uke 5-7 er merket med gult (n=3), pasienter med avstøtning før dag 6-9 (n=2) og subklinisk avstøtning ved 1 år (n=1) er merket med rødt. Celler ble inkubert i 72 timer med eller uten stimulering.



Ved analyse av hypoxantin i pasientprøver var 43 % av stimulerte og 60 % av non-stimulerte prøver under det validerte måleområdet, og resultatene blir derfor ikke vist her.

## 5.6 Cytokiner som biomarkører

### 5.6.1 Legemiddelselektivitet hos friske

Fullblod fra tre friske personer (som ikke brukte immundempende legemidler) ble pre-inkubert 30 minutter med MPA 1,0 mg/L (fullblod), everolimus 10 µg/L, takrolimus 8 µg/L, CsA 150 µg/L og prednisolon 45 µg/L (fullblod), før fullblod ble inkubert i 72 timer med *ex vivo*-stimulering. Cytokinene IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$  ble analysert i supernatanten. Resultatene er oppsummert i figur 22. Alle cytokinverdiene fra takrolimusprøven hos den ene friske var under måleområdet for analysemetoden. Det var sannsynligvis en teknisk feil med denne prøven, og verdiene som her blir oppgitt for takrolimus er derfor beregnet fra kun to personer.

Takrolimus gav median 47 (43-50) % hemming av IL-2 i forhold til kontroll. Prednisolon og everolimus så ikke ut til å gi noen hemming. MPA og CsA gav henholdsvis 12 (8,4-41) % og 14 (8,7-34) % reduksjon av IL-2-nivåer.

For IL-6 var det kun prednisolon som ikke gav noen hemming. MPA gav median 17 (6-26) % hemming, CsA gav median 19 (16-27) % hemming, everolimus gav median 24 (22-34) % hemming og takrolimus gav median 26 (18-33) % hemming.

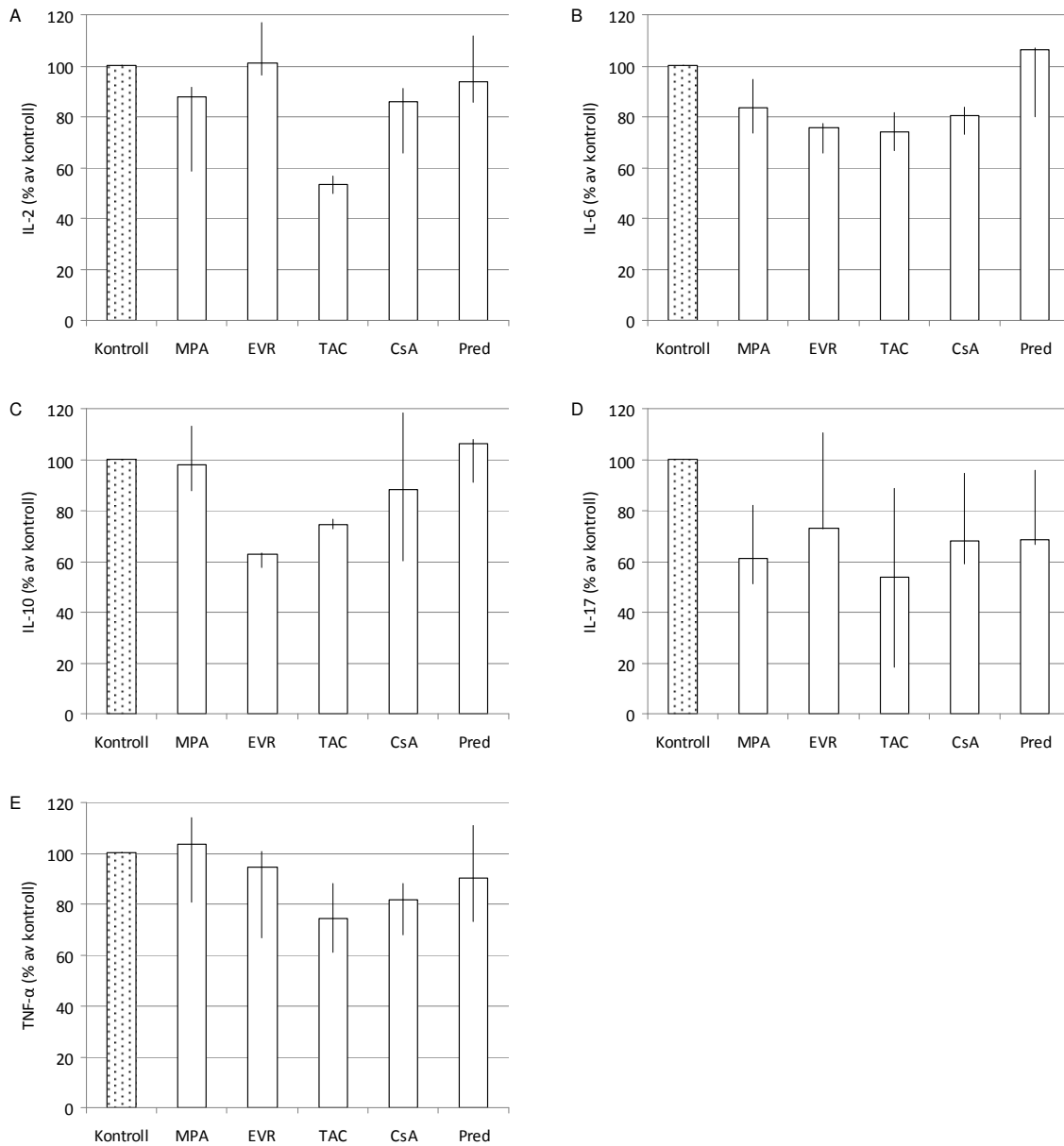
MPA og prednisolon gav ingen reduksjon av IL-10-nivåer, men takrolimus gav median 25 (23-27) % reduksjon og everolimus gav median 37 (37-42) % reduksjon. CsA gav median 12 (-18-40) % reduksjon av IL-10-nivåer, men spredningen var stor blant de tre personene.

Alle de immundempende legemidlene viste tendens til reduksjon av IL-17 nivåer.

Medianverdiene av IL-17-reduksjonen for everolimus var 27 (-11-27) %, for CsA 32 (5,2-41) %, for prednisolon 32 (4,0-34) %, for MPA 39 (18-49) % og for takrolimus 46 (12-81) %.

Spredningen var relativt stor for alle legemidlene.

Kun kalsineurinhemmerne takrolimus og CsA gav hemming av TNF- $\alpha$ . CsA gav median 18 (12-32) % hemming og takrolimus gav median 25 (12-39) % hemming.



**Figur 22:** Legemiddelselektivitet for cytokinene interleukin (IL)-2 (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-17 (D) og tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  (E) målt i supernatant fra stimulert fullblod hos tre friske personer. Fullblod ble inkubert med legemidlene mykofenolat (MPA, 1,0 mg/L), takrolimus (TAC, 8  $\mu$ g/L), ciklosporin (CsA, 150  $\mu$ g/L), everolimus (EVR, 10  $\mu$ g/L) og prednisolon (Pred, 45  $\mu$ g/L). Fullblod ble deretter stimulert og inkubert i 72 timer. Cytokinmengden i prøvene ble beregnet i % av kontroll uten legemiddeltilsetning. Median (min-maks), n=3 for alle prøver bortsett fra TAC, hvor n=2.

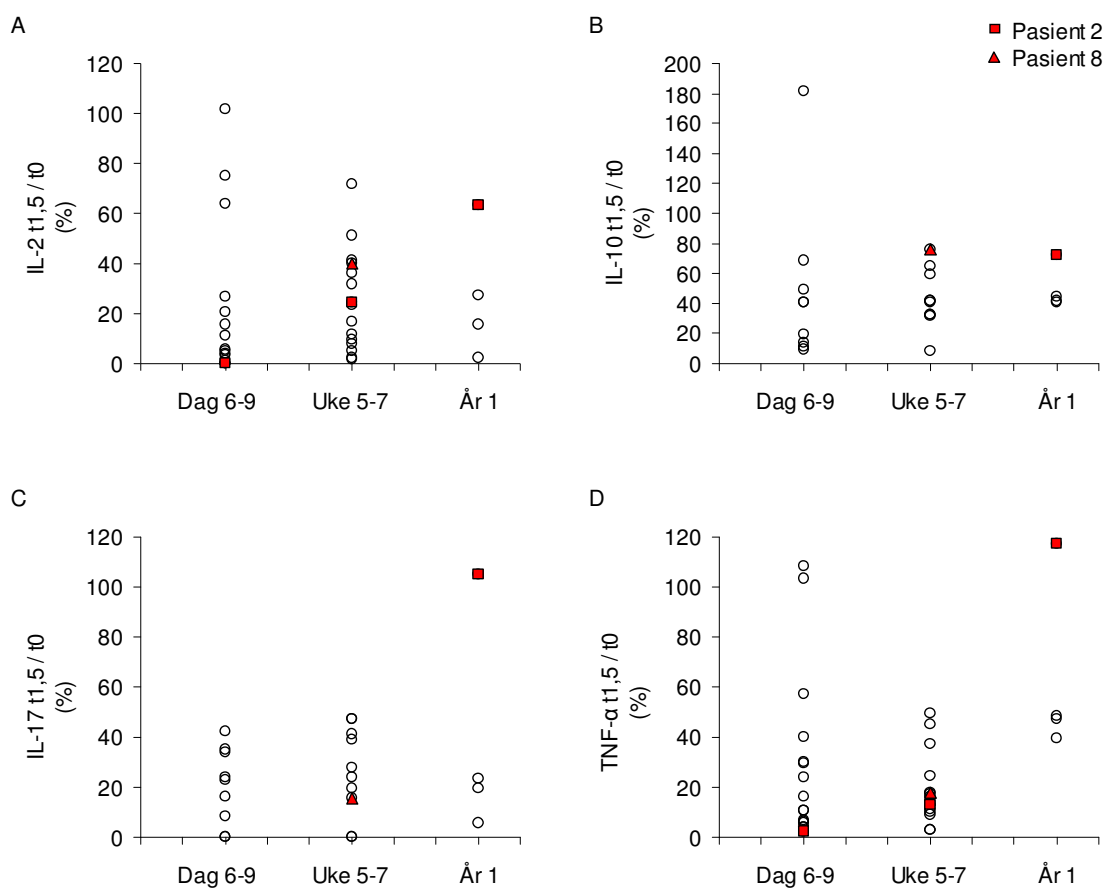
### 5.6.2 Cytokiner målt før og etter transplantasjon

Supernatant fra *ex vivo*-stimulert fullblod inkubert i 72 timer ble brukt til cytokinanalyse.

Cytokiner som ble analysert var IL-2, IL-6, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$ .

Ved 1-årsprøven fikk pasient 2 påvist subklinisk avstøtningsepisode. Det ble samtidig påvist høyere relative cytokinverdier ( $t_{1,5}$  i % av  $t_0$ ) for IL-2 (63 %), IL-10 (72 %), IL-17 (105 %) og TNF- $\alpha$  (117 %) enn hos de andre pasientene (figur 23). Pasienten hadde da MPA-konsentrasjoner på 2,6 ( $t_0$ ) og 5,7 ( $t_{1,5}$ ) mg/L, og takrolimuskonsentrasjoner på 4,0 ( $t_0$ ) og 4,7 ( $t_{1,5}$ )  $\mu$ g/L. Den samme pasienten fikk antireksjonsbehandling ved dag 6-9, og de relative nivåene av IL-2 og TNF- $\alpha$  var da svært lave. Nivåene av IL-10 og IL-17 ble kun målt i 1 årsprøven hos denne pasienten. På grunn av teknisk feil med analysen er 6-9 dagers-prøven fra den andre pasienten som fikk antireksjonsbehandling utelatt fra resultatene.

Viremipasientene skilte seg ikke ut fra de andre pasientene verken ved absolutte eller relative cytokinverdier.



**Figur 23:** Relative cytokinverdier for A) interleukin (IL)-2, B) IL-10, C) IL-17 og D) tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  målt i supernatant fra inkubert fullblod. Fullblod ble stimulert og inkubert i 72 timer. Relative cytokinverdier oppgis som cytokinivåer 1,5 time etter legemiddelinntak ( $t_{1,5}$ ) i % av nivåer før legemiddelinntak ( $t_0$ ) ved dag 6-9, uke 5-7 og år 1 etter transplantasjon. Pasient med cellulær avstøtningsepisode etter fire dager og subklinisk avstøtningsepisode etter 1 år er merket med rød firkant. Pasient med antistoffmediert avstøtningsepisode etter tre dager er merket med rød trekant.

### **5.6.3 Sammenheng mellom cytokiner og takrolimuskonsentrasjon hos nyretransplanterte**

Det ble utført korrelasjonstest for absolutte cytokinnivåer mot takrolimuskonsentrasjon ved 5-7 uker  $t_0$  og  $t_{1,5}$  for cytokinene IL-2, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$ . Det var ingen signifikant korrelasjon for noen av cytokinene. Det var heller ingen signifikant korrelasjon mellom relative cytokinnivåer ( $t_{1,5}$  i % av  $t_0$ ) ved 5-7 uker i forhold til takrolimuskonsentrasjon ved  $t_{1,5}$ .

## 6 DISKUSJON

### 6.1 Farmakokinetikk

#### 6.1.1 Plasmakonsentrasjon av mykofenolat

Ved dag 6-9 hadde åtte pasienter MPA  $C_0$  under 1,9-3,5 mg/L, som i en konsensusrapport ble anbefalt som terapeutisk konsentrasjonsområde for nyretransplanterte som bruker MPA i kombinasjon med takrolimus (37). Pasient 2 hadde MPA  $C_0$  1,8 mg/L og pasient 8 hadde  $C_0$  0,2 mg/L ved dag 6-9, da begge gjennomgikk avstøtningsepisoder. Ved uke 5-7 var pasient 2 innenfor ønsket konsentrasjonsområde, men pasient 8 hadde  $C_0$  1,2 mg/L. Pasient 8 hadde altså lavest MPA  $C_0$  av de 17 inkluderte pasientene ved begge prøvetidspunkter. Ulike studier har bekreftet et forhold mellom tidlig MPA-eksponering og risiko for akutt avstøtning de første tre månedene etter transplantasjon. Det nedre nivået for MPA-eksponering som gir signifikant økt risiko for avstøtning varierte mellom studiene. En *post hoc*-analyse av 590 pasienter viste at MPA  $C_0 < 1,6$  mg/L ved samtidig bruk av takrolimus gav økt risiko for avstøtning. Andre studier har brukt AUC-verdier, og van Gelder *et al.* viste at tidlig MPA  $AUC_{0-12t} < 30$  mg×h/L var korrelert med risiko for biopsiverifisert avstøtning (37). En analyse av 50 nyretransplanterte pasienter som brukte MMF og takrolimus viste at  $C_0$  på minimum 1,9 mg/L førte til at 83 % av pasientene fikk  $AUC_{0-12t}$  over 30 mg×h/L (76). Ved Rikshospitalet blir MPA-monitorering brukt som et hjelpemiddel, men justering av dose skjer i større grad ut fra klinisk hendelser som for eksempel bivirkninger, enn ut fra MPA-konsentrasjoner.

Ved  $t_0$  dag 6-9 hadde kun én pasient MPA  $C_0 > 3,5$  mg/L, men ved uke 5-7 var fire pasienter over 3,5 mg/L. Bivirkninger relatert til bruk av MPA er kvalme, diaré, hematologiske bivirkninger som leukopeni og anemi, og infeksjoner (37). Ingen av de tre pasientene som gjennomgikk viremi i løpet av studien hadde  $C_0 > 3,5$  mg/L ved noen av prøvetidspunktene. Den øvre grensen for ønsket konsentrasjonsområde (MPA  $C_0$  3,5 mg/L) er valgt på grunn av at effekten ikke forbedres ved høyere konsentrasjoner. Det er ikke definert et øvre nivå for utvikling av toksiske effekter (76). Når alle pasientene har fullført studien vil flere kliniske endepunkter, som leukopeni og andre bivirkninger, settes i sammenheng med legemiddelkonsentrasjoner i blod/plasma.

## 6.1.2 Blodkonsentrasjon av takrolimus

Ved dag 6-9 var det kun pasient 8 som var under terapeutisk område for takrolimus med  $C_0$  2,5  $\mu\text{g/L}$ . Pasienten var da under behandling med ATG, og hadde fått halvert takrolimusdosene. Terapeutisk område for takrolimus rett før inntak av legemiddeldose er 3-7  $\mu\text{g/L}$  de første 180 dagene post-Tx, deretter 3-5  $\mu\text{g/L}$ . Det ble ikke sett store avvik fra disse verdiene blant pasientene i studien. For høye takrolimusdoser over tid kan gi bivirkninger som økt infeksjonstendens, og på lengre sikt nefrotoksisitet. For lave doser øker risikoen for avstøtningsepisoder (22).

## 6.2 Metabolsk aktivitet som biomarkør

### 6.2.1 Legemiddelrespons målt før transplantasjon

Metabolsk aktivitet ble brukt som markør for å måle konsentrasjonsavhengige effekter av immundempende legemidler på aktiveringsgraden i *ex vivo*-stimulerte PBMC. Det ble antatt at metabolsk aktivitet kunne brukes som en generell markør for lymfocytters aktiveringsgrad, og dermed gi et mål på legemidlenes immunsuppresjon på tvers av ulike virkemekanismer. PBMC proliferasjonsgrad har blitt brukt som generell markør på immunaktivering i tidligere studier (77,78).

Det ble konstruert legemiddelresponskurver for takrolimus, mykofenolat og everolimus for fem friske personer og for ti nyretransplanterte pasienter ved å plote aktiveringsgrad mot legemiddelkonsentrasjoner. De tre legemidlene ble valgt for å representere de ulike immundempende legemiddelgruppene. Takrolimus og MPA er en del av standardbehandlingen for nyretransplanterte pasienter, og everolimus er den mest brukte mTOR-hemmeren. Det ble ikke konstruert responskurver for prednisolon, da denne metoden tidligere har vist usystematisk forløp av responskurver ved tilsetning av relevante prednisolonkonsentrasjoner. Det har tidligere blitt vist at verken metanol eller legemidlene i seg selv bidrar til absorbans ved 450 nm (58).

MPA gav median 92 % maksimal inhibering av aktiveringsgrad i PBMC fra pasienter, og median minimumsnivå på 0,2, som betyr at metabolsk aktivitet var lavere i stimulerte celler tilsatt MPA enn i non-stimulerte celler u/MPA. Høy maksimal inhibering og lavt minimumsnivå for MPA har også blitt observert i tidligere studier i PBMC stimulert med

phytohemagglutinin (PHA) (77). Det har i tillegg blitt vist at non-stimulerte PBMC inkubert med MPA ikke gav tilsvarende hemming av metabolsk aktivitet som i stimulerede celler (58). Dette kan tyde på at MPA er mer potent i stimulerede lymfocytter i forhold til non-stimulerede, noe som samsvarer med våre resultater for IMPDH-aktivitet og purinbaser. Det er mulig at aktiverte celler blir apoptotiske når MPA hemmer syntesen av guaninnukleotider, som de er avhengige av for proliferasjon. MPAs virkemekanisme kan også spille inn. Siden MPA er en unkompetitiv inhibitor vil legemiddelet kun bindes til IMPDH etter at IMP er bundet til enzymet. Ved immunaktivering oppreguleres purinsyntesen, og økte nivåer av IMP kan dermed medføre økt binding av MPA til IMPDH. En annen forklaring kan også være at IMPDH type 2, som er mer sensitiv for MPA-hemming, oppreguleres i større grad enn IMPDH type 1 når PBMC stimuleres med PMA og ionomycin. Det ble ikke utført spesifikke analyser for IMPDH type 1 og 2 i denne studien..

Everolimus hemmet aktiveringsgraden i betraktelig lavere grad enn MPA, og i noe lavere grad enn takrolimus. Både MPA og takrolimus viste non-lineært forløp hvor responskurvene flatet ut ved høyere legemiddelkonsentrasjoner. Everolimus viste tegn til non-lineært forløp med utflating hos noen personer, men hos andre personer ble aktiveringsgraden kun lett redusert ved økende konsentrasjoner. Dette kan skyldes at everolimus hemmer cellyklus på et senere stadium enn takrolimus og MPA.

IC<sub>50</sub> ble brukt som mål på legemiddelkonsentrasjon som gav 50 % hemming av aktiveringsgrad, og ble estimert ut fra responskurvene. MPA gav liten variasjon av IC<sub>50</sub> blant pasientene, men takrolimus og everolimus gav større variasjon. Verdiene av IC<sub>50</sub> kan sannsynligvis ikke overføres direkte til *in vivo*-verdier. Dersom IC<sub>50</sub> estimeres for en større pasientgruppe, kan verdier sammenlignes og variasjon i legemiddelsensitivitet mellom ulike pasienter kan vurderes opp mot kliniske endepunkter. Et større materiale av pasientdata er nødvendig for å trekke konklusjoner.

Det ble i denne studien ikke sett noen sammenheng mellom høy immunsuppressiv legemiddelsensitivitet pre-Tx og viremi post-Tx. I forhold til medianverdien hadde de to virempasientene høyere minimumsnivåer på responskurvene, noe som indikerer at de ikke var mer sensitive for immundempende legemidler enn de andre pasientene. Pasient 16 hadde derimot svært lav maksimal inhibering for takrolimus (15 %), og skulle ut fra dette trenge høyere doser for å oppnå nok immunsuppresjon. Dette var samme pasient som ble behandlet for en mistenkt avstøtningsepisode, og senere fikk CMV. Kurata *et al.* konstruerte

responskurver pre-Tx for immundepende legemidler basert på carboxyfluorescein diacetat succinimidylester (CFSE)-basert flowcytometri, og fant store interindividuelle forskjeller for CsA og takrolimus. Pasienter med lavt minimumsnivå av CsA var mer utsatt for viremier de tre første månedene post-Tx, og det ble derfor foreslått at disse pasientene burde bruke lavere doser av CsA eller MPA (77). Da vår studie hittil har responskurver fra kun to virempasienter, hvorav den ene har en mulig forklaring for viremiepisoden ved behandling for mistenkt avstøtning, er det for lite data til å trekke konklusjoner. Det kan heller ikke sees bort fra at legemiddelsensitiviteten kan endre seg etter transplantasjon. Når alle pasientene har fullført studien vil kliniske endepunkter igjen vurderes opp mot konstruerte responskurver og responskurvevariabler, og sammenheng mellom legemiddelsensitivitet pre-Tx og klinisk utfall vil vurderes på nytt.

### **6.2.2 Aktiveringsgrad målt før og etter transplantasjon**

Friske personer hadde median 2,0 ganger høyere aktiveringsgrad enn pasienter ved pre-Tx-prøvetidspunkt. Det er mulig at generell sykdomsstatus hos pasienter påvirker aktiveringsgraden. En annen årsak kan være bruk av ulike legemidler utenom immundepende legemidler, som muligens påvirker aktiveringsgraden.

Det ble observert høyere aktiveringsgrad post-Tx hos pasienter som ikke brukte MPA sammenlignet med de andre pasientene. Ved konstruering av legemiddelresponskurver ble det sett tegn til at metabolsk aktivitet som markør var mer sensitiv for MPA enn for takrolimus. Som nevnt i avsnitt 6.2.1 kan det virke som om MPA er mer potent i stimulerte PBMC enn i non-stimulerte, noe som vil gi sterk hemming av aktiveringsgrad når MPA er tilstede. I tillegg til dette kan prøveopparbeidelsen spille inn. Det har tidligere blitt vist at MPA vaskes ut av lymfocytter under isolering av PBMC (79). Siden MPA hovedsakelig distribueres i plasma ble 10 % heparinplasma fra opprinnelig prøve tilsatt PBMC-suspensjonen som skulle inkuberes (i stedet for kalveserum som ofte brukes som supplement i dyrkningsmedier). Takrolimus og everolimus bindes i stor grad til røde blodceller og i mindre grad til plasmaproteiner, og det er mulig at MPA totalt sett dominerte ved tilsetning av plasma fra den opprinnelige prøven.

Som forventet ble det sett reduksjon i aktiveringsgraden fra pre-Tx til  $t_0$  ved dag 6-9 og uke 5-7 ( $P < 0,05$ ), noe som kan forklares ved pasientenes bruk av immundepende legemidler post-Tx. Det var noe uventet at aktiveringsgraden ikke ble signifikant redusert fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ , verken



ved dag 6-9 eller uke 5-7. Det viste seg at mange pasienter fikk økt aktiveringsgrad ved  $t_{1,5}$  i forhold til  $t_0$ . Dette kan henge sammen med at flere av disse pasientene fikk redusert metabolsk aktivitet i non-stimulerte celler i større grad enn i stimulerte celler ved  $t_{1,5}$  i forhold til  $t_0$ . Det kan tenkes at de var så immunsupprimerte ved  $t_0$  at det ikke ble oppnådd videre hemming av celleproliferasjon i stimulerte celler etter inntak av legemiddeldose.

De to pasientene som fikk påvist avstøtningsepisoder første uken post-Tx hadde svært lav aktiveringsgrad ved dag 6-9, noe som kan forklares ved at de begge var under rejeksjonsbehandling. Pasient 2 hadde pre-Tx aktiveringsgrad i øvre sjikt. I tillegg hadde pasienten høyere aktiveringsgrad enn de to andre pasientene som brukte MPA ved både  $t_0$  og  $t_{1,5}$  ved år 1. Dette samsvarer med at pasienten fikk påvist subklinisk avstøtningsepisode, og dermed hadde aktivert immunstatus. For pasient 2 kan aktiveringsgrad ha vist seg å reflektere subklinisk avstøtningsepisode, men det trengs flere data for å understøtte denne observasjonen.

Den ene pasienten med polyomavirus rundt uke 10 hadde tendens til lav aktiveringsgrad (< median) ved uke 5-7, som er prøvetidspunktet nærmest viremi. I tillegg ble det sett sterk hemming av aktiveringsgrad fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  hos CMV-pasienten ved uke 5-7. Det er mulig at lav aktiveringsgrad eller sterk hemming av aktiveringsgrad fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  kan assosieres med nærstående viremi, men flere data trengs for å trekke konklusjoner. Wieland *et al.* påviste assosiasjon mellom redusert proliferasjonsgrad av PBMC (målt ved bromodeoksyridintest) og leukopeni på dag 7 post-Tx hos nyretransplanterte pasienter. Proliferasjonsgrad ble ikke assosiert med avstøtningsepisoder, infeksjoner (deriblant CMV og polyomavirus) eller gastrointestinale bivirkninger registrert de første tre månedene post-Tx (78).

### **6.2.3 Aktiveringsgrad i forhold til legemiddelkonsentrasjoner**

Det ble valgt å utføre korrelasjonstest mellom aktiveringsgrad og legemiddeleksponering ved uke 5-7 for at pasientene skulle være stabilisert på ønskede legemiddelkonsentrasjoner og for å unngå pasienter med rejeksjonsbehandling. Det ble observert tendens til korrelasjon mellom aktiveringsgrad og MPA- og takrolimuskonsentrasjon, men det var ikke statistisk signifikant. Manglende korrelasjon med enkeltlegemidler kan stemme overens med at aktiveringsgrad er en generell markør.

## 6.3 IMPDH-aktivitet og purinbaser som biomarkører

### 6.3.1 Legemiddelselektivitet hos friske

Legemiddelkonsentrasjonene som ble valgt ved undersøkelse av legemiddelselektivitet for IMPDH-aktivitet og purinbaser, var MPA 1,0 mg/L (fullblod, tilsvarer 2,0 mg/L plasma), takrolimus 8 µg/L, CsA 150 µg/L, everolimus 10 µg/L og prednisolon 45 µg/L (fullblod, tilsvarer 90 µg/L plasma). Konsentrasjonene ble valgt ut fra terapeutiske  $C_0$ -verdier som tilstrebes i perioden etter nyretransplantasjon. Anbefalt  $C_0$  for MPA etter nyre-Tx er 1,0-3,5 mg/L (plasma) uten kombinasjon med CNI (37), for takrolimus 3-7 µg/L dag 0-180 post-Tx (13), for CsA 150-250 µg/L dag 29-60 post-Tx (13), for everolimus 3-8 µg/L ved trippelregime bestående av CNI, GK og mTOR-hemmer (42) og for prednisolon har det blitt målt  $C_0$  fra 16-133 µg/L (plasma) dag 6-10 etter levertransplantasjon (80).  $C_0$ -konsentrasjoner ble valgt for å unngå for høye legemiddelkonsentrasjoner hvor det kunne være fare for at IMPDH-aktivitet (og cytokinproduksjon, hvor samme konsentrasjoner ble valgt) skulle hemmes ned mot nullnivå. Det har tidligere blitt målt IMPDH-aktivitet og cytokinproduksjon hos en frisk person ved tilsetning av legemiddelløsning til PBMC (IMPDH-aktivitet) og fullblod (cytokinproduksjon), hvor konsentrasjonene ble valgt ut fra  $IC_{50}$  og konsentrasjon som gav maksimum hemming ( $IC_{maks}$ ) bestemt ved responskurver fra forsøk med metabolsk aktivitet. Alle legemidlene gav da IMPDH-hemming ved  $IC_{maks}$  i stimulerede PBMC, og prednisolon gav 96 % hemming ved 2000 µmol/L, som nok overstiger terapeutisk relevant konsentrasjon (58). Undersøkelse av legemiddelselektivitet bør videre suppleres med forsøk hvor det tilsettes høyere konsentrasjoner av de immundempende legemidlene, for eksempel tilnærmet terapeutisk  $C_{maks}$ , for å bekrefte at ingen av legemidlene påvirker IMPDH-aktivitet i tiden etter inntak av legemiddeldose, og ikke bare ved  $C_0$ .

IMPDH-aktivitet målt i non-stimulerte, ikke-inkuberte PBMC betraktes som en spesifikk markør for MPA. Det er så langt vi vet ingen andre som har målt IMPDH-aktivitet i *ex vivo*-stimulerte PBMC fra pasienter, og vi ønsket å vurdere legemiddelselektiviteten for metoden. Utfra resultatene ser IMPDH-aktivitet ut til å være en spesifikk markør for MPA både i non-stimulerte og stimulerte PBMC, da kun MPA gav signifikant enzymhemming i forsøkene. Det ble heller ikke observert additive eller synergistiske effekter av legemidler i kombinasjon med MPA. Utfra forsøkene så MPA ut til å være en mer potent hemmer av IMPDH-aktivitet i

stimulerte celler enn i non-stimulerte. Dette har blitt vist i tidligere forsøk (58), og kan henge sammen med MPAs virkemekanisme, som beskrevet i avsnitt 6.2.1.

Det ble observert en overraskende økning av guanin i non-stimulerte PBMC tilsatt MPA. Økningen var derimot ikke stor (12 %), og siden mange av guaninverdiene i non-stimulerte celler var utenfor metodens måleområde kan ikke resultatene regnes som pålitelige. I stimulerte PBMC gav MPA sterk reduksjon av guaninnivåer (73 %), og everolimus gav også moderat reduksjon (20 %). Resultatene for adenin lignet resultater for guanin, bortsett fra litt mindre reduksjon av adeninnivåer. Dette tyder på at guanin og adenin i stimulerte celler kan brukes som selektiv markør for MPA, men ikke i non-stimulerte. Det er tegn til at everolimus kan hemme guaninnivåene, og til en viss grad adeninnivåene, i stimulerte PBMC. Siden ingen av pasientene i studien har brukt legemiddelregime med everolimus, har guanin og adenin blitt brukt som markører for MPA.

### 6.3.2 IMPDH-aktivitet målt før og etter nyretransplantasjon

Forskjellen i IMPDH-aktivitet mellom stimulerte og non-stimulerte PBMC ble redusert fra pre- til post-Tx for pasienter m/MPA, noe som kan reflektere at MPA er mer potent i stimulerte celler. Hos pasienter u/MPA var forskjellen i stimulert vs. non-stimulert IMPDH-aktivitet liten fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ . Det var tendens til økt forskjell mellom stimulerte og non-stimulerte celler 1 år post-Tx hos dem som brukte MPA.

I non-stimulerte celler ble det sett hemming av IMPDH-aktivitet fra pre-Tx til post-Tx, men det var ingen signifikant hemming fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  ved post-Tx-prøvetidspunkter. Dette samsvarer ikke med resultater fra tidligere studier, hvor redusert IMPDH-aktivitet i sirkulerende lymfocytter har blitt observert i doseintervallet etter inntak av MMF (81,82). Resultatene kan trolig ikke sammenlignes direkte, da vår metode inkluderer et ekstra vasketrinn av PBMC i forhold til de andre metodene (vasking etter 72 timers inkubering). Dette medfører en grad av utvasking av MPA før man måler IMPDH-aktiviteten i cellelysate. Våre resultater i non-stimulerte celler fungerer derfor best til å vurdere forskjellen som *ex vivo*-stimulering utgjør.

I stimulerte PBMC ble det sett sterkere reduksjon av IMPDH-aktivitet fra pre-Tx til post-Tx enn i non-stimulerte PBMC. Det var i tillegg sterk hemming av IMPDH-aktivitet fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ , noe som kan tyde på at IMPDH-aktiviteten hemmes raskere i stimulerte celler enn non-stimulerte ved MPA-dosering. Det ble sett noe reduksjon av IMPDH-aktivitet fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$

også hos pasienter u/MPA, noe som kan tyde på at IMPDH-aktivitet i stimulerede celler ikke er helt selektivt for MPA. Dette bekrefter at legemiddelselektivitet hos friske bør måles med høyere doser av de ulike immundempende legemidlene enn vi brukte. IMPDH-aktivitet kan potensielt gjøre et skifte mot generell biomarkør ved *ex vivo*-stimulering. En årsak til dette kan være at legemidler som hemmer immunaktivering samtidig kan hemme induksjon av IMPDH-aktivitet som forekommer ved celleproliferasjon.

I stimulerede PBMC ble det observert høyere IMPDH-aktivitet hos friske enn hos pasienter u/MPA pre-Tx. Dette kan for eksempel skyldes pasientenes generelle sykdomstilstand, eller bruk av legemidler med ukjent effekt på IMPDH-aktivitet.

Viremi-pasientene hadde lav IMPDH-aktivitet i non-stimulerede celler pre-Tx, og dette kan være en potensiell markør for å predikere viremi post-Tx. Det har tidligere blitt vist at lav IMPDH-aktivitet i sirkulerende PBMC pre-Tx var assosiert med komplikasjoner i forhold til MPA-behandling (52).

Pasient 2 (avstøtningspasient) hadde høy IMPDH-aktivitet pre-Tx i både non-stimulerede og stimulerede celler, og hadde i tillegg høy IMPDH-aktivitet i stimulerede celler ved 1 år, da pasienten hadde subklinisk avstøtning. Utfra disse begrensede resultatene kan IMPDH-aktivitet i stimulerede celler tolkes som både prediktiv og deskriptiv markør for avstøtning. Pasient 8 hadde fått MPA pre-Tx og kan ikke vurderes med tanke på prediktivt høy IMPDH-aktivitet. Ved 6-9 dager fikk begge pasientene rejeksjonsbehandling, og dette prøvetidspunktet kan derfor ikke vurderes med tanke på IMPDH-aktivitet som deskriptiv markør, siden den kraftige rejeksjonsbehandlingen sannsynligvis har innvirkning på *ex vivo*-stimuleringen. Høy IMPDH-aktivitet i sirkulerende PBMC pre-Tx har tidligere blitt assosiert med avstøtningsepisoder (52). En påfølgende prospektiv studie støttet derimot ikke disse funnene (82). Chiarelli *et al.* konkluderte med at den store interindividuelle variabiliteten i IMPDH-aktivitet begrenset nytteverdien av å bruke enkeltmålinger som prediktiv markør. De observert derimot korrelasjon mellom avstøtningsepisoder og økende IMPDH-verdier basert på lineær regresjon av IMPDH-aktivitet over tid, og konkluderte med at monitorering av IMPDH-aktivitet kunne være aktuelt for å forutse avstøtningsepisoder (50).

Én pasient hadde svært høy IMPDH-aktivitet i stimulerede PBMC ved  $t_0$  både dag 6-9 og uke 5-7. Pasienten hadde ganske lav MPA-konentrasjon ved dag 6-9 (0,5 mg/L), men dette alene kan nok ikke forklare den høye IMPDH-aktiviteten. Det har tidligere blitt observert store

interindividuelle forskjeller i IMPDH-aktivitet (35), noe som kan grunnes for eksempel ulike genetiske varianter av *IMPDH1* og 2. Ved slutten av studien skal pasientenes IMPDH-aktivitet settes i sammenheng med deres genvarianter for *IMPDH1* c.579+119G>A (rs2278293), *IMPDH1* c.580-106G>A (rs2278294) og *IMPDH2* c.819+10T>C (rs11706052), som tidligere har blitt assosiert med klinisk utfall etter transplantasjon (54,56).

### **6.3.3 Sammenheng mellom IMPDH-aktivitet og mykofenolat hos nyretransplanterte**

Korrelasjonstest for IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC i forhold til plasmakonsentrasjoner av MPA viste statistisk signifikans ved uke 5-7  $t_0$  og  $t_{1,5}$ , med korrelasjonskoeffisienter på henholdsvis -0,72 og -0,65. Pasienter var da stabilisert på ønskede legemiddeldoseringer, og ingen pasienter gjennomgikk rejeksjonsbehandling. Det ble fremdeles sett en del interindividuell variabilitet, spesielt ved  $t_0$ . Chiarelli *et al.* viste at avstøtningspasienter hadde høyere IMPDH-aktivitet ved både  $t_0$  og  $t_2$  i forhold til pasienter uten avstøtning, uten at det var signifikant forskjell i pasientenes MPA-konsentrasjoner (50). Dette støtter teorien om at målinger av IMPDH-aktivitet kan supplere konsentrasjonsmålinger ved MPA-behandling.

### **6.3.4 Purinbaser målt før og etter nyretransplantasjon**

I non-stimulerte celler var ikke guanin- og adeninnivåene til de to pasientene u/MPA høyere enn for resten av pasientgruppen, og det ble heller ikke observert tydelige endringsmønstre i verdiene. Dette samsvarer med våre resultater fra forsøk hos friske, hvor det ble konkludert at guanin og adenin i non-stimulerte PBMC ikke kan brukes som markør for MPAs umiddelbare effekt. Det er likevel mulig at guanin og adenin endrer seg over tid i non-stimulerte celler fra pasienter m/MPA. Guanin og GTP målt i sirkulerende lymfocytter har tidligere vist reduserte nivåer ved MPA-behandling over tid etter lever- og nyretransplantasjon (59,83). Det ble ikke observert reduksjon av guanin utover i enkeltdoseforløpet, noe som indikerer at guanin i non-stimulerte celler kan brukes som markør for langsiktig respons hos pasienter som står på vedvarende MPA-dosering (59).

I stimulerte celler hadde de to pasientene u/MPA mye høyere nivåer av guanin og adenin post-Tx enn de andre pasientene. Det ble også sett tydelige og forventede endringsmønstre i guanin- og adeninverdiene for pasienter m/MPA, både med reduksjon fra pre-Tx til alle prøvetidspunkter post-Tx, og med reduksjon fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$  både ved dag 6-9 og uke 5-7.

Pasienter u/MPA hadde ikke tydelige endringsmønstre i guanin- og adeninnivåer. Dette undersøtter vår teori om at guanin og adenin i stimulerte PBMC kan brukes som farmakodynamiske markører for MPA. Det vil være gunstig å inkludere flere HLA-identiske pasienter i studien for å kunne utføre statistiske analyser mellom pasienter m/ og u/MPA.

Adenin og guanin samvarierte i stor grad, noe som har blitt observert i både nyre- og levertransplanterte pasienter tidligere (58,59). Det har tidligere blitt vist at prolifererende celler som ble eksponert for MPA *in vitro* fikk reduserte nivåer av ATP (62), men mekanismen er ikke kjent. Det kan for eksempel henge sammen med redusert aktivitetsnivå i cellene, som kan påvirke purinsyntesen i sin helhet. I nysyntesen (*de novo*-syntesen) av GMP og AMP kreves henholdsvis ATP og GTP, og det forekommer derfor en positiv feedback-mekanisme hvor GTP fremmer AMP-syntese og ATP fremmer GMP-syntese (49). Dette kan potensielt spille en rolle i den observerte samvariasjonen mellom guanin og adenin.

I non-stimulerte celler hadde pasient 2 høye guaninnivåer pre-Tx. Pasienten hadde avstøtningsepisode første uke post-Tx og etter 1 år. I tillegg hadde pasienten høyest både guanin- og adeninnivåer 1 år post-Tx av pasienter m/MPA. I stimulerte PBMC hadde pasient 2 høyest både guanin og adenin av alle pasienter pre-Tx. I tillegg hadde pasient 16, som senere fikk viremi (CMV), relativt lave nivåer pre-Tx. På grunn av få episoder med avstøtning og viremi kan det ikke dras konklusjoner fra resultatene, men det er mulighet for at guanin- og adeninnivåer kan brukes som både prediktive og deskriptive markører for klinisk utfall ved nyre-Tx.

Ved avsluttet studie kan enkeltpasienters guanin- og adeninnivåer med fordel sammenlignes med IMPDH-aktivitet for å undersøke sammenhengen bedre og gi mer kunnskap om MPAs virkemekanisme. Markørene vil i tillegg kunne settes i sammenheng med genvariantene *IMPDH1* c.579+119G>A (rs2278293), *IMPDH1* c.580-106G>A (rs2278294) og *IMPDH2* c.819+10T>C (rs11706052).

## 6.4 Cytokiner som biomarkører

### 6.4.1 Legemiddelselektivitet hos friske

Det ble valgt å analysere cytokiner i supernatant fra stimulert fullblod. Tidligere forsøk med samme metode har vist at cytokinmengden i supernatant fra non-stimulert fullblod var så lav at

den ikke var detekterbar. For de fem første pasientene har det tidligere også blitt målt cytokiner i supernatant fra stimulerte PBMC. Fordelen med å måle cytokiner i fullblod fremfor PBMC er at biologiske forhold ivaretas bedre, og legemiddelinteraksjoner med naturlig matriks av blodkomponenter bevares. I tillegg slipper man utvaskingseffekter av legemidler ved PBMC-isoleringen, og prøveopparbeidelsen er enklere og mindre tidkrevende (44). En ulempe med fullblod som matriks er at immuncelletallet er ukjent, dette kan derimot kompenseres for ved å hente ut leukocytall fra pasientjournalene for aktuelle prøvetidspunkter. Ved metodeutvikling ble 3 timer vurdert som inkuberingstid for *ex vivo*-stimulert fullblod, men ikke alle cytokiner var detekterbare etter 3 timer (58), og vi valgte derfor å bruke 72 timers inkuberingstid i disse forsøkene.

Takrolimus så ut til å gi selektiv hemming av IL-2 med median 47 % hemming mot kun median 12 og 14 % for henholdsvis MPA og CsA. Grunnen til at CsA gav mindre hemming enn takrolimus kan være at det var lavere konsentrasjon av CsA i forhold til terapeutiske konsentrasjoner. Det bør suppleres med forsøk hvor legemiddelkonsentrasjonene er noe høyere, for å se om IL-2 kan være en selektiv markør for CNI. Det har tidligere blitt vist doseavhengig hemming av IL-2-ekspressjon for takrolimus og CsA, men ikke for sirolimus, MPA eller metylprednisolon (44). IL-2-produksjon målt i supernatant fra *ex vivo*-stimulert fullblod inkubert i 5 timer har tidligere reflektert effekt av både CNI og MPA. Siden det ikke ble observert hemmende effekt av MPA på kalsineurinaktiviteten, ble det konkludert at MPAs IL-2-hemming kom fra proliferasjonshemmingen av aktiverte lymfocytter (84). I tillegg har Liu *et al.* vist hemming av IL-2 produksjon ved både GK- (deksametason) og MPA-tilsetning i *ex vivo*-stimulert fullblod (69).

IL-6 så ut til å bli hemmet av både MPA, takrolimus, CsA og everolimus, og kan muligens brukes som en generell markør for immundemping. Serres *et al.* har kvantifisert cytokiner i supernatant fra PBMC som ble inkubert uten stimulering, og funnet at høye IL-6-nivåer hadde sammenheng med akutt avstøtning av nyregraft (85).

IL-10, som er et anti-inflammatorisk cytokin, ble hemmet av takrolimus (25 %) og everolimus (37 %). Studier av IL-10 sin effekt på avstøtning hos transplanterte viser motstridende resultater. Hos hjertetransplanterte barn har det blitt vist sammenheng mellom genotyper som gir økt IL-10-produksjon og beskyttelse mot avstøtning (86). Hos nyretransplanterte har det derimot blitt påvist assosiasjon mellom høy serum-IL-10 pre-Tx og avstøtningsepisoder (66,67). Det ble konkludert at de høye IL-10-nivåene pre-Tx indikerte aktivert immunstatus

og pågående inflammasjon, som økte risikoen for avstøtningsepisoder post-Tx (67). Det er nødvendig med flere studier for å bekrefte IL-10 sin rolle hos nyretransplanterte. Dersom det skulle vise seg at IL-10 virker anti-inflammatorisk post-Tx er det uheldig om de immundepende legemidlene hemmer IL-10-produksjonen. Våre forsøk har så langt inkludert for få personer til å trekke konklusjoner, og det bør i tillegg gjøres forsøk med flere legemiddelkonsentrasjoner.

Resultatene for IL-17 viste relativt store variasjoner interindividuell, men medianverdiene viste at alle legemidlene i forsøket gav reduksjon av IL-17. Våre resultater indikerer at IL-17 kan være en potensiell generell markør for immunsuppresjon. Det har tidligere blitt vist at både GK (deksametason) og MPA hemmer IL-17-produksjon i fullblod inkubert med mitogenet PHA (69). CNI har vist hemming av IL-17-produksjon i PBMC, men resultatene er ikke konsekvente (68).

TNF- $\alpha$  ble kun hemmet av kalsineurinhemmerne CsA og takrolimus. Produksjonen av TNF- $\alpha$  reguleres av NFAT, som aktiveres av CN. Det er dermed ikke uventet om cytokinet kan brukes som selektiv markør for CNI (22).

#### **6.4.2 Cytokiner målt før og etter transplantasjon**

IL-2, IL-6, og TNF- $\alpha$  ble målt i supernatant fra *ex vivo*-stimulert fullblod hos alle pasienter. Hos de fem første pasientene har IFN- $\gamma$  og GM-CSF tidligere blitt forsøkt målt, men det var vanskelig å måle disse to sammen med de andre cytokinene. IFN- $\gamma$  ble høy ved stimulering og GM-CSF ble lav, derfor havnet begge utenfor metodens måleområde når prøvene ble fortynnet slik at de andre cytokinene var innenfor måleområdene. For de resterende pasientene ble IL-10 og IL-17 målt i stedet for IFN- $\gamma$  og GM-CSF. IFN- $\gamma$  og GM-CSF kan måles i separate analyser på et senere stadium.

Pasient 2 hadde høye relative nivåer ( $t_{1,5}$  i % av  $t_0$ ) av cytokiner samtidig med at pasienten fikk påvist subklinisk avstøtning. Nivåene av IL-17 og TNF- $\alpha$  var spesielt høye. Et voksende antall studier har bekreftet IL-17 sin rolle ved avstøtning av transplantat, deriblant nyregraft. Hemming av IL-17 reduserer rekruttering av immunceller til inflammasjonsstedet og hemmer modning av APC (68). Det har tidligere blitt påvist forhøyet ekspresjon av både IL-17 og TNF- $\alpha$  i biopsi fra nyregraftet til pasienter med akutt avstøtning (87).



Absoluttnivåer av cytokinene så ikke ut til å ha noen sammenheng verken med avstøtning eller viremi. Det kan senere suppleres med beregninger av cytokinutskillelse i forhold til lymfocytall, for å se om dette gir bedre sammenheng med viremi- og avstøtningspasienter.

### **6.4.3 Sammenheng mellom cytokiner og takrolimuskonsentrasjon hos nyretransplanterte**

Det var ingen signifikant korrelasjon mellom verken IL-2, IL-10, IL-17 eller TNF- $\alpha$  og takrolimuskonsentrasjon 5-7 uker post-Tx. Dette kan tyde på at ingen av cytokinene er selektive markører for takrolimus. De store interindividuelle forskjellene som ble observert, vil også redusere sannsynligheten for å se korrelasjon i et forholdsvis lite pasientmateriale som dette.

## 7 KONKLUSJON

Biomarkørene metabolsk aktivitet relatert til mitokondrielle dehydrogenaser, IMPDH-aktivitet og purinbaser ble målt i non-stimulerte og stimulerte PBMC fra 17 nyretransplanterte pasienter. I tillegg ble cytokinproduksjon målt i supernatant fra stimulert fullblod, og pasientenes legemiddelsensitivitet før transplantasjon ble vurdert med metabolsk aktivitet som markør. Biomarkørenes legemiddelselektivitet ble vurdert i PBMC og blod fra fem friske personer.

Metabolsk aktivitet og cytokinproduksjon av IL-6, og IL-17 fremstod som mulige generelle markører. Kalsineurinhemmere hadde den mest fremtredende effekten på IL-2 og TNF- $\alpha$ , og produksjonen av IL-10 ble sterkest hemmet av mTOR- og kalsineurinhemmere. IMPDH-aktivitet, guanin og adenin i stimulerte PBMC fremstod som selektive markører for mykofenolats effekt. Flere forsøk hvor høyere konsentrasjoner av immundempende legemidler tilsettes PBMC og fullblod fra friske er nødvendig for å bekrefte resultatene.

Aktiveringsgrad i PBMC beregnet som metabolsk aktivitet i stimulerte celler i forhold til non-stimulerte viste signifikant reduksjon fra pre-Tx til prøvetidspunkter post-Tx, men ikke fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ . Aktiveringsgrad kan potensielt både predikere og reflektere avstøtningsepisoder og viremier, men det er nødvendig med data fra flere pasienter for å trekke konklusjoner.

Responskurver, plottet som metabolsk aktivitet i stimulerte PBMC mot legemiddelkonsentrasjon, ble konstruert for takrolimus, mykofenolat og everolimus i forkant av transplantasjon. Responskurvevariablene  $IC_{50}$ , maksimal inhibering, minimumsnivå og  $AUC_r$  viste ingen sammenheng med avstøtning eller viremi i det begrensede datamaterialet.

Høy relativ cytokinproduksjon ( $t_{1,5}$  i forhold til  $t_0$ ) av IL-2, IL-10, IL-17 og TNF- $\alpha$  kan potensielt reflektere avstøtningsepisode, men data fra flere pasienter trengs for å trekke konklusjoner.

I forsøk hos friske var mykofenolat en 2,6 ganger sterkere hemmer av IMPDH-aktivitet i stimulerte PBMC enn i non-stimulerte. Hos pasienter var det i tillegg korrelasjon mellom IMPDH-aktivitet i stimulerte celler og mykofenolatkonsentrasjon 5-7 uker post-Tx. IMPDH-aktivitet, guanin og adenin i stimulerte PBMC ble redusert fra pre-Tx til alle prøvetidspunkter post-Tx, og fra  $t_0$  til  $t_{1,5}$ . Ut fra resultatene så langt kan IMPDH-aktivitet, guanin og adenin i

stimulerte PBMC være både prediktive og reflekterende biomarkører for klinisk utfall etter nyretransplantasjon.

Når alle pasientene ( $n = 30$ ) har fullført pilotstudien, bør biomarkørene vurderes mot flere kliniske endepunkter, og korrelasjonsanalyser mellom legemiddeleksponering og biomarkører bør utføres på nytt. Potensielle biomarkører bør velges ut og undersøkes nærmere i en større studie av nyretransplanterte, slik at eventuell klinisk nytteverdi av farmakodynamisk legemiddelmonitorering kan demonstreres.

## REFERANSER

1. Thorsby, E. (2006). "[Transplantation medicine in Norway through 50 years]." Tidsskr Nor Laegeforen. 126: 3305-3310.
2. Årsrapport organdonasjon og transplantasjon 1. januar - 31. desember 2011. <http://www.oslo-universitetssykehus.no/SiteCollectionDocuments/Om%20oss/Avdelinger/Spesialisert%20medisin%20og%20kirurgi/4%20kvar%202011.pdf> (Tilgjengelig 13.12.12).
3. Jørgensen, P.F. (2011). "Nyretransplantasjon - kirurgisk perspektiv." Kirurgen. 154-158.
4. Albrechtsen, D. (1999). "[Is organ transplantation beneficial?]." Tidsskr Nor Laegeforen. 119: 3886.
5. Westlie, L., Leivestad, T., Holdaas, H., Lien, B., Hartmann, A., Fauchald, P. (2003). "[Is current practice concerning living donors in kidney transplantations acceptable?]." Tidsskr Nor Laegeforen. 123: 1063-1065.
6. Reisaeter, A.V., Foss, A., Hartmann, A., Leivestad, T., Midtvedt, K. (2011). "The kidney transplantation program in Norway since 2000." Clin Transpl. 111-118.
7. Årsrapport organdonasjon og transplantasjon 1. januar - 31. desember 2012. <http://www.slideshare.net/organdonasjon/4-kvartal-2012-2> (Tilgjengelig 5.1.13).
8. Parham, P. (2009). "The Immune System.", 3rd edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
9. Laperrousaz, S., Tiercy, J., Villard, J., Ferrari-Lacraz, S. (2012). "HLA and non-HLA polymorphisms in renal transplantation." Swiss Med Wkly. 142: w13668.
10. Alonso, A.R., Lopez-Vazquez, A., Lopez-Larrea, C. (2012). "Immunology and the challenge of transplantation." Adv Exp Med Biol. 741: 27-43.
11. Duncan, M.D., Wilkes, D.S. (2005). "Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections." Proc Am Thorac Soc. 2: 449-455.
12. Afzali, B., Lechler, R.I., Hernandez-Fuentes, M.P. (2007). "Allorecognition and the alloresponse: clinical implications." Tissue Antigens. 69: 545-556.
13. Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet (2012). Protokoll for nyre-transplantasjon og pancreas-transplantasjon.
14. Bergan, S., Albrechtsen, D., Bentdal, O. (1999). "[Immunosuppressive agents in organ transplantation]." Tidsskr Nor Laegeforen. 119: 3615-3620.
15. Moreso, F., Hernandez, D. (2013). "Has the survival of the graft improved after renal transplantation in the era of modern immunosuppression?" Nefrologia. 33: 14-26.

16. Sayegh, M.H., Carpenter, C.B. (2004). "Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises." *N Engl J Med.* 351: 2761-2766.
17. Whiting, K.P., Restall, C.J., Brain, P.F. (2000). "Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms." *Life Sci.* 67: 743-757.
18. Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids." *Clin Pharmacokinet.* 44: 61-98.
19. Gaston, R.S. (2009). "Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity: reflections on an evolving paradigm." *Clin J Am Soc Nephrol.* 4: 2029-2034.
20. Kapturczak, M.H., Meier-Kriesche, H.U., Kaplan, B. (2004). "Pharmacology of calcineurin antagonists." *Transplant Proc.* 36: 25S-32S.
21. Webster, A.C., Woodroffe, R.C., Taylor, R.S., Chapman, J.R., Craig, J.C. (2005). "Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data." *BMJ.* 331: 810.
22. van Rossum, H.H., de Fijter, J.W., van Pelt, J. (2010). "Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives." *Ther Drug Monit.* 32: 3-10.
23. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." *Drugs.* 67: 369-391.
24. Haufroid, V., Mourad, M., Van Kerckhove, V., Wawrzyniak, J., De, M.M., Eddour, D.C., et al. (2004). "The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients." *Pharmacogenetics.* 14: 147-154.
25. Barry, A., Levine, M. (2010). "A systematic review of the effect of CYP3A5 genotype on the apparent oral clearance of tacrolimus in renal transplant recipients." *Ther Drug Monit.* 32: 708-714.
26. Cortazar, F., Molnar, M.Z., Isakova, T., Czira, M.E., Kovesdy, C.P., Roth, D., et al. (2012). "Clinical outcomes in kidney transplant recipients receiving long-term therapy with inhibitors of the mammalian target of rapamycin." *Am J Transplant.* 12: 379-387.
27. Bentley, R. (2000). "Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant." *Chem Rev.* 100: 3801-3826.
28. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group (1995). Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet.* 345: 1321-1325.

29. Sollinger, H.W. (1995). "Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group." *Transplantation*. 60: 225-232.
30. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group (1996). A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 61: 1029-1037.
31. Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., Natsumeda, Y. (1993). "Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases." *J Biol Chem*. 268: 27286-27290.
32. Hedstrom, L. (2009). "IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition." *Chem Rev*. 109: 2903-2928.
33. Wieland, E., Olbricht, C.J., Susal, C., Gurragehaa, P., Bohler, T., Israeli, M., et al. (2010). "Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients." *Ther Drug Monit*. 32: 560-572.
34. Devyatko, E., Zuckermann, A., Bohdjalian, A., Roedler, S., Dunkler, D., Grimm, M., et al. (2006). "Activation of the purine salvage pathway in mononuclear cells of cardiac recipients treated with mycophenolate mofetil." *Transplantation*. 82: 113-118.
35. Glander, P., Hambach, P., Liefeldt, L., Budde, K. (2012). "Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation." *Clin Chim Acta*. 413: 1391-1397.
36. Staatz, C.E., Tett, S.E. (2007). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients." *Clin Pharmacokinet*. 46: 13-58.
37. Kuypers, D.R., Le Meur, Y., Cantarovich, M., Tredger, M.J., Tett, S.E., Cattaneo, D., et al. (2010). "Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation." *Clin J Am Soc Nephrol*. 5: 341-358.
38. Bunnapradist, S., Ambuhl, P.M. (2008). "Impact of gastrointestinal-related side effects on mycophenolate mofetil dosing and potential therapeutic strategies." *Clin Transplant*. 22: 815-821.
39. Pascual, J. (2009). "The use of everolimus in renal-transplant patients." *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2: 9-21.
40. Kawahara, T., Asthana, S., Kneteman, N.M. (2011). "m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation?" *J Hepatol*. 55: 1441-1451.
41. Lebwohl, D., Anak, O., Sahnoud, T., Klimovsky, J., Elmroth, I., Haas, T., et al. (2013). "Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases." *Ann N Y Acad Sci*. (Epub).
42. Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2006). "The role of therapeutic drug monitoring in individualizing immunosuppressive drug therapy: recent developments." *Ther Drug Monit*. 28: 720-725.

43. Holdaas, H., Midtvedt, K., Asberg, A. (2012). "A drug safety evaluation of everolimus in kidney transplantation." *Expert Opin Drug Saf.* 11: 1013-1022.
44. Bohler, T., Nolting, J., Kamar, N., Gurrachaa, P., Reisener, K., Glander, P., et al. (2007). "Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans." *Ther Drug Monit.* 29: 77-86.
45. Hirano, T. (2007). "Cellular pharmacodynamics of immunosuppressive drugs for individualized medicine." *Int Immunopharmacol.* 7: 3-22.
46. Biomarkers Definitions Working Group (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." *Clin Pharmacol Ther.* 69: 89-95.
47. Takeuchi, H., Hirano, T., Oka, K., Mizumoto, K., Akashi, T., Sakurai, E., et al. (1998). "Lymphocyte sensitivity to cyclosporine and tacrolimus in chronic renal failure patients and clinical significance in renal transplantation." *Transplant Proc.* 30: 36-39.
48. Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnol Annu Rev.* 11: 127-152.
49. Zimmermann, A.G., Gu, J.J., Laliberte, J., Mitchell, B.S. (1998). "Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: regulation of expression and role in cellular proliferation and T lymphocyte activation." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 61: 181-209.
50. Chiarelli, L.R., Molinaro, M., Libetta, C., Tinelli, C., Cosmai, L., Valentini, G., et al. (2010). "Inosine monophosphate dehydrogenase variability in renal transplant patients on long-term mycophenolate mofetil therapy." *Br J Clin Pharmacol.* 69: 38-50.
51. Maiguma, T., Yosida, T., Otsubo, K., Okabe, Y., Sugitani, A., Tanaka, M., et al. (2010). "Evaluation of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase activity during maintenance therapy with tacrolimus." *J Clin Pharm Ther.* 35: 79-85.
52. Glander, P., Hambach, P., Braun, K.P., Fritsche, L., Giessing, M., Mai, I., et al. (2004). "Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation." *Am J Transplant.* 4: 2045-2051.
53. Patel, C.G., Richman, K., Yang, D., Yan, B., Gohh, R.Y., Akhlaghi, F. (2007). "Effect of diabetes mellitus on mycophenolate sodium pharmacokinetics and inosine monophosphate dehydrogenase activity in stable kidney transplant recipients." *Ther Drug Monit.* 29: 735-742.
54. Wang, J., Zeevi, A., Webber, S., Girnita, D.M., Addonizio, L., Selby, R., et al. (2007). "A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity." *Pharmacogenet Genomics.* 17: 283-290.
55. Wang, J., Yang, J.W., Zeevi, A., Webber, S.A., Girnita, D.M., Selby, R., et al. (2008). "IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients." *Clin Pharmacol Ther.* 83: 711-717.

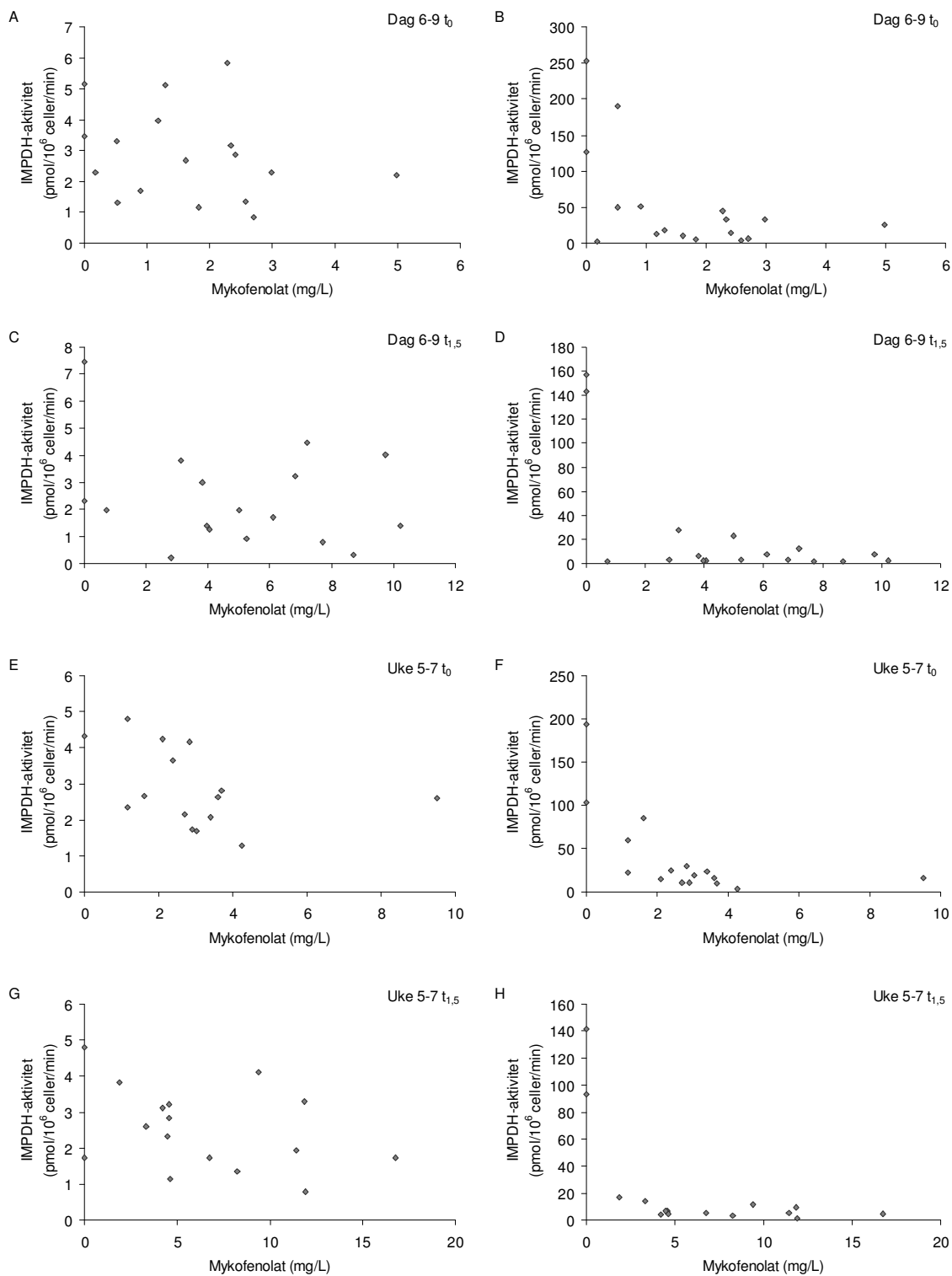
56. Grinyo, J., Vanrenterghem, Y., Nashan, B., Vincenti, F., Ekberg, H., Lindpaintner, K., et al. (2008). "Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation." *Transpl Int.* 21: 879-891.
57. de Jonge, H., Naesens, M., Kuypers, D.R. (2009). "New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation." *Ther Drug Monit.* 31: 416-435.
58. Berg, C. (2012). "Farmakodynamiske biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte." *Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.*
59. Ali, A.M. (2011). "Molekylær farmakodynamikk hos levertransplanterte: IMPDH og purinbaser som mulige biomarkører for mykofenolats effekt." *Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.*
60. Qiu, Y., Fairbanks, L.D., Ruckermann, K., Hawrlowicz, C.M., Richards, D.F., Kirschbaum, B., et al. (2000). "Mycophenolic acid-induced GTP depletion also affects ATP and pyrimidine synthesis in mitogen-stimulated primary human T-lymphocytes." *Transplantation.* 69: 890-897.
61. Daxecker, H., Raab, M., Cichna, M., Markl, P., Muller, M.M. (2001). "Determination of the effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool of human peripheral blood mononuclear cells in vitro by high-performance liquid chromatography." *Clin Chim Acta.* 310: 81-87.
62. Vethe, N.T., Bremer, S., Bergan, S. (2008). "IMP dehydrogenase basal activity in MOLT-4 human leukaemia cells is altered by mycophenolic acid and 6-thioguanosine." *Scand J Clin Lab Invest.* 68: 277-285.
63. Vethe, N.T., Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. (2008). "Pharmacodynamics of mycophenolic acid in CD4+ cells: a single-dose study of IMPDH and purine nucleotide responses in healthy individuals." *Ther Drug Monit.* 30: 647-655.
64. Crispim, J.C., Grespan, R., Martelli-Palomino, G., Rassi, D.M., Costa, R.S., Saber, L.T., et al. (2009). "Interleukin-17 and kidney allograft outcome." *Transplant Proc.* 41: 1562-1564.
65. Berber, I., Yigit, B., Isitmangil, G., Tellioglu, G., Ozgezer, T., Gulle, S., et al. (2008). "Evaluation of pretransplant serum cytokine levels in renal transplant recipients." *Transplant Proc.* 40: 92-93.
66. Fitzgerald, J.T., Johnson, J.R., Perez, R.V. (2004). "Pre-transplant elevations of interleukin-12 and interleukin-10 are associated with acute rejection after renal transplantation." *Clin Transplant.* 18: 434-439.
67. Karczewski, J., Karczewski, M., Glyda, M., Wiktorowicz, K. (2008). "Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection." *Transplant Proc.* 40: 3390-3392.
68. Abadja, F., Sarraj, B., Ansari, M.J. (2012). "Significance of T helper 17 immunity in transplantation." *Curr Opin Organ Transplant.* 17: 8-14.



69. Liu, Z., Yuan, X., Luo, Y., He, Y., Jiang, Y., Chen, Z.K., et al. (2009). "Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood." *Cytokine*. 45: 141-147.
70. Abadja, F., Atemkeng, S., Alamartine, E., Berthoux, F., Mariat, C. (2011). "Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response." *Transplantation*. 92: 396-403.
71. Nakagiri, T., Inoue, M., Minami, M., Shintani, Y., Okumura, M. (2012). "Immunology mini-review: the basics of T(H)17 and interleukin-6 in transplantation." *Transplant Proc*. 44: 1035-1040.
72. Chakrabarti, R., Kumar, S., Chakrabarti, R. (1999). "Relative roles of T-cell receptor ligands and interleukin-2 in driving T-cell proliferation." *J Cell Biochem*. 76: 37-43.
73. Wolfson, M., McPhail, L.C., Nasrallah, V.N., Snyderman, R. (1985). "Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme." *J Immunol*. 135: 2057-2062.
74. Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., Geha, R. (1989). "Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin." *J Immunol*. 143: 1283-1289.
75. Bead-based multiplexing of up to 500 analytes per well.  
<http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/> (Tilgengeligg 22.4.13).
76. van Gelder, T., Le Meur, Y., Shaw, L.M., Oellerich, M., DeNofrio, D., Holt, C., et al. (2006). "Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation." *Ther Drug Monit*. 28: 145-154.
77. Kurata, Y., Kato, M., Kuzuya, T., Miwa, Y., Iwasaki, K., Haneda, M., et al. (2009). "Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T-cell proliferation assay." *Clin Pharmacol Ther*. 86: 285-289.
78. Wieland, E., Shipkova, M., Martius, Y., Hasche, G., Klett, C., Bolley, R., et al. (2011). "Association between pharmacodynamic biomarkers and clinical events in the early phase after kidney transplantation: a single-center pilot study." *Ther Drug Monit*. 33: 341-349.
79. Glander, P., Braun, K.P., Hambach, P., Bauer, S., Mai, I., Roots, I., et al. (2001). "Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydro-genase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells." *Clin Biochem*. 34: 543-549.
80. Saeves, I., Line, P.D., Bergan, S. (2012). "The pharmacokinetics of prednisolone and prednisone in adult liver transplant recipients early after transplantation." *Ther Drug Monit*. 34: 452-459.

81. Glander, P., Hambach, P., Braun, K.P., Fritsche, L., Waiser, J., Mai, I., et al. (2003). "Effect of mycophenolate mofetil on IMP dehydrogenase after the first dose and after long-term treatment in renal transplant recipients." *Int J Clin Pharmacol Ther.* 41: 470-476.
82. Sombogaard, F., van Schaik, R.H., Mathot, R.A., Budde, K., van der Werf, M., Vulto, A.G., et al. (2009). "Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism." *Pharmacogenet Genomics.* 19: 626-634.
83. Jagodzinski, P., Lizakowski, S., Smolenski, R.T., Slominska, E.M., Goldsmith, D., Simmonds, H.A., et al. (2004). "Mycophenolate mofetil treatment following renal transplantation decreases GTP concentrations in mononuclear leucocytes." *Clin Sci (Lond).* 107: 69-74.
84. Millan, O., Brunet, M., Campistol, J.M., Faura, A., Rojo, I., Vidal, E., et al. (2003). "Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil." *Clin Chem.* 49: 1891-1899.
85. De Serres, S.A., Mfarrej, B.G., Grafals, M., Riella, L.V., Magee, C.N., Yeung, M.Y., et al. (2012). "Derivation and validation of a cytokine-based assay to screen for acute rejection in renal transplant recipients." *Clin J Am Soc Nephrol.* 7: 1018-1025.
86. Awad, M.R., Webber, S., Boyle, G., Sturchioc, C., Ahmed, M., Martell, J., et al. (2001). "The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome." *J Heart Lung Transplant.* 20: 625-630.
87. de Menezes Neves, P.D., Machado, J.R., dos Reis, M.A., Faleiros, A.C., de Lima Pereira, S.A., Rodrigues, D.B. (2013). "Distinct expression of interleukin 17, tumor necrosis factor alpha, transforming growth factor beta, and forkhead box P3 in acute rejection after kidney transplantation." *Ann Diagn Pathol.* 17: 75-79.

# APPENDIX



**Figur A1:** IMPDH (inosin monofosfat dehydrogenase)-aktivitet i non-stimulerte (A, C, E, G) og stimulerte (B, D, F, H) PBMC (mononukleære celler i perifert blod) mot plasmakonsentrasjon av mykofenolat ved dag 6-9 før legemiddelinntak (t<sub>0</sub>, A, B) og 1,5 time etter legemiddelinntak (t<sub>1,5</sub>, C, D) og ved uke 5-7 t<sub>0</sub> (E, F) og t<sub>1,5</sub> (G, H).