

Individualisering av kalsineurinhemmerbehandling hos nyretransplanterte pasienter ved hjelp av farmakodynamiske og -genetiske analyser

Elisabet Dahl Johansson



Masteroppgave i farmakologi

Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

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

Mai 2013

Masteroppgave i farmakologi for graden master i farmasi

Individualisering av

kalsineurinhemmerbehandling hos

nyretransplanterte pasienter ved hjelp av

farmakodynamiske og -genetiske analyser

Elisabet Dahl Johansson

Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

og

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

Veiledere:

Sara Bremer, Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet

Stein Bergan, Avdeling for farmakologi, Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet og

Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

© Elisabet Dahl Johansson

2013

Individualisering av kalsineurinhemmerbehandling hos nyretransplanterte pasienter ved hjelp av farmakodynamiske og -genetiske analyser

Elisabet Dahl Johansson

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

Bakgrunn: Kalsineurinhemmere (CNI), ciklosporin eller takrolimus, inngår i de fleste immundepende regimer etter organtransplantasjon. Til tross for at doseringen individualiseres etter blodkonsentrasjonsmålinger, er CNI-behandling assosiert med nyretoksisitet og bivirkninger som bidrar til økt risiko for infeksjoner, kreft og kardiovaskulære hendelser. Ytterligere optimalisering av CNI-doseringen kan være en mulig strategi for å bedre langtidsresultatene (>1 år) etter transplantasjon.

Hensikt: Formålet med prosjektet var å undersøke muligheten for ytterligere individualisering av takrolimusbehandling ved hjelp av farmakodynamiske og farmakogenetiske analyser. Takrolimus hemmer kalsineurin og dermed transkripsjonen av NFAT-regulerte cytokiner. Relativ hemming av NFAT-regulert genekspressjon 1,5 timer etter dose kan være en potensiell farmakodynamisk markør for takrolimus-effekt. Takrolimus metaboliseres av enzymene CYP3A5 og CYP3A4. Informasjon om genvarianter med betydning for enzymaktiviteten kan være nyttig for å predikere nødvendig takrolimusdose.

Materialer og metode: Det har så langt blitt inkludert 17 nyretransplanterte pasienter som behandles med takrolimus. Det ble tatt prøver før transplantasjon og i tre perioder etter transplantasjon (pre- og 1,5 timer post-dose). Etter *ex vivo* stimulering med mitogener ble NFAT-regulert genekspressjon (*IL2*, *IFNG*, *CSF2*) målt vha. revers transkripsjon og sanntids-PCR på LightCycler® 480 (Roche, Tyskland). Genotyping av CYP3A4 (*1 og 22) og CYP3A5 (*1 og *3) ble gjort ved smeltekurvsanalyse på LightCycler® 480.

Resultater: Med unntak av to målinger, så var alle pre-dose konsentrasjoner (C_0) innenfor det ønskede området (3-7 eller 8-12 $\mu\text{g/L}$, avhengig av risiko) 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon. Det var derimot betydelig forskjell i takrolimuseksponering (4,7-25,3 $\mu\text{g/L}$) mellom pasientene 1,5 timer etter dose ($C_{1,5}$), med en tendens til reduksjon i takrolimus $C_{1,5}$ fra median 13,4 $\mu\text{g/L}$ etter 1 uke til 8,3 $\mu\text{g/L}$ etter 6 uker. Den farmakodynamiske responsen var kraftig uke 1, med median 89 % (31-98 %) hemming av NFAT-regulerte cytokiner 1,5 timer post-dose. Graden av hemming korrelerte med takrolimus $C_{1,5}$ etter 1 uke ($r_s=0,72$; $P\leq 0,001$), men ikke etter 6 uker og 1 år. Det var en tendens til endring i cytokinrespons over tid, og 6 uker etter transplantasjon var median hemming redusert til 48 % (6-76 %); $P=0,062$). To pasienter opplevde akutt reaksjon og fikk reaksjonsbehandling første uke etter transplantasjon. Pågående reaksjonsbehandling ble assosiert med lavere cytokinekspressjon

(30 ganger lavere, $P \leq 0,05$). Pasientene med tidligere rejeksjonsepisoder hadde ved senere prøvetidspunkt signifikant lavere cytokinhemming ($P \leq 0,05$) og en av pasientene utviklet også senere en subklinisk rejeksjon. To andre pasienter utviklet polyomavirus viremi 2-3 måneder etter transplantasjon. Pasientene hadde høy grad av cytokinhemming, 97,5 og 84,5 %, i forkant av viremieepisodene. Nyrefunksjon (glomerulær filtrasjonshastighet, GFR) 1 år etter transplantasjon viste tendens til invers korrelasjon med takrolimus $C_{1,5}$ ($r = -0,866$; $n=5$, $P=0,057$), og signifikant korrelasjon med NFAT-regulert genekspresjon 1,5 timer post-dose ($r_s=1,00$; $n=4$; $P \leq 0,01$). To pasienter var heterozygote for CYP3A5*1, og én av disse var i tillegg heterozygot for CYP3A4*22. Pasientene med CYP3A5-uttrykk hadde lavere median dosenormalisert takrolimus pre-dosekonsentrasjon sammenlignet med pasientene uten CYP3A5-uttrykk (median 96,9 vs. 192,2 $\mu\text{g/L}$; $P \leq 0,05$).

Konklusjon: Til tross for takrolimus C_0 innenfor terapeutisk område, var det stor variabilitet i takrolimus $C_{1,5}$, grad av cytokinhemming og klinisk utfall blant pasientene. Resultatene fra pilotstudien støtter teorien om at NFAT-regulert genekspresjon er en lovende metode for ytterligere individualisering av CNI-behandling, og kan bidra med nyttig informasjon i forbindelse med etablering av monitoreringsstrategi. Kunnskapen om NFAT-regulert genekspresjon under takrolimusbehandling og i tidlig fase etter nyretransplantasjon er imidlertid begrenset og det trengs mer kunnskap om målområde for cytokinekspresjon, andre påvirkningsfaktorer og ulike pasientpopulasjoner. Pasienter som uttrykte CYP3A5 hadde lavere dosenormalisert takrolimuskonsentrasjon og økt dosebehov. Kunnskap om CYP3A5-genotype før oppstart av behandlingen gir mulighet for riktigere dosering fra start og kortere tid før pasientene oppnår terapeutisk konsentrasjon. Bedre individualisering av takrolimusbehandlingen ved farmakokinetiske og -genetiske målinger kan igjen bidra til å bedre langtidsresultatene etter transplantasjon.

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Avdeling for medisinsk biokjemi og Avdeling for farmakologi ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet, i perioden august 2012 til mai 2013. Oppgaven ble utført i nært samarbeid med hovedveileder Sara Bremer. Internveileder har vært Stein Bergan

Jeg vil først og fremst takke Sara for uvurderlig god hjelp og veiledning. Takk for et sosialt og koselig år og for alle gode diskusjoner og faglige tilbakemeldinger. Du har lært meg utrolig masse om et spennende fagfelt, og alltid stilt opp hvis det er noe jeg har lurt på eller trengt hjelp til.

Videre vil jeg takke Stein for all praktisk hjelp med studien, dine gode faglige innspill og for interessen du har vist for det arbeidet jeg har gjort.

Takk til Nils Tore og Kristine for samarbeidet med studien. Takk også til resten av kollokviegruppen for mange hyggelige og lærerike møter med gode diskusjoner.

Takk til hele gjengen på FARM for det fantastiske arbeidsmiljøet og alle de hyggelige kaffe- og lunsjpausene. Jeg gleder meg til Italia-tur sammen med dere til høsten ☺

Takk til Marit og alle inne på GEN for at dere alltid har vært så hjelpsomme og fleksible.

Jeg vil også takke Pål-Dag Line og Morten Skauby på transplantasjonskirurgisk seksjon og Karsten Midtvedt på nyremedisinsk seksjon, for samarbeid og hjelp med prøveanskaffelse til pilotstudien.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og ikke minst Thomas for all støtte og oppmuntring gjennom hele dette året.

Jeg vil se tilbake på dette året på Rikshospitalet som et givende, spennende, lærerikt, utfordrende og morsomt år.

Oslo, mai 2013

Elisabet Dahl Johansson

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Organtransplantasjon.....	1
1.1.1	Nyretransplantasjon.....	1
1.2	Avstøtningsreaksjon.....	2
1.2.1	Humane leukocyt-antigener.....	2
1.2.2	Rejeksjonstyper.....	3
1.2.3	ABO-antigener.....	4
1.2.4	Sensibilisering.....	5
1.3	Immunsuppressiv behandling.....	5
1.3.1	Takrolimus.....	8
1.3.2	Rejeksjonsbehandling.....	12
1.3.3	Infeksjoner og profylaktisk behandling.....	12
1.4	Individualisert kalsineurinhemmerbehandling.....	13
1.4.1	Farmakokinetisk monitorering.....	13
1.4.2	Farmakogenetiske analyser.....	14
1.4.3	Farmakodynamiske analyser.....	15
2	Problemstilling.....	19
3	Materialer og metode.....	20
3.1	Reagenser og utstyr.....	20
3.2	Pilotstudie.....	22
3.2.1	Pasientprøver.....	22
3.3	<i>Ex vivo</i> lymfocytaktivering i fullblod.....	23
3.4	Isolering av RNA til genekspressjonsanalyser.....	24
3.5	Isolering av DNA til genotyping.....	26
3.6	cDNA-syntese.....	26
3.7	PCR.....	27
3.7.1	Sanntids-PCR.....	28
3.7.2	Genotyping ved sanntids-PCR og smeltekurveanalyse.....	33
3.8	Kliniske endepunkter.....	36
3.9	Statistikk.....	36

4	Resultater.....	37
4.1	Pasienter	37
4.2	Takrolimuskonsentrasjon	38
4.3	NFAT-regulert genekspressjon.....	41
4.4	Kliniske endepunkter.....	42
4.5	Genotyping av CYP3A-enzymet	48
5	Diskusjon.....	50
5.1	Pilotstudie.....	51
5.2	Fremtidsutsikter.....	56
6	Konklusjon	58
	Litteraturliste	59
	Vedlegg	67

FORKORTELSER

ABCB1	ATP-bindende kassett-transportør B1; Permeabilitets-glykoprotein; P-gp
ALAS	5-aminolevulinatsyntase 1
AP-1	Aktivatorprotein-1
ATG	Antitymocytglobulin
AUC	Arealet under konsentrasjon-tidskurven
B2M	Beta-2-mikroglobulin
C ₀	Blodkonsentrasjon av legemiddel pre-dose
C _{1,5}	Blodkonsentrasjon av legemiddel 1,5 timer etter legemiddelinntak
C ₂	Blodkonsentrasjon av legemiddel 2 timer etter legemiddelinntak
Ca ²⁺	Kalsium
CD	Differensieringsantigen (Cluster of differentiation)
CMV	Cytomegalovirus
CNI	Kalsineurinhemmer
Cp	Terskelsyklus (Crossing point)
CsA	Ciklosporin
CSF-2	Kolonistimulerende faktor-2
CYP	Cytokrom P-450
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
FDA	Food and Drug Administration
FKBP	FK506-bindende protein
FRET	Fluorescens resonans energioverføring
GC	Glukokortikoid
GFR	Glomerulær filtrasjonshastighet
HLA	Humane leukocyt-antigener
mTor	Mechanistic target of rapamycin
IMPDH	Inosinmonofosfatdehydrogenase
IFNG	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
LBB	Lysis-/Binding Buffer
MDRD	Modification of diet in renal disease

MHC	Hovedhistokompatibilitetskompleks
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nukleærfaktor- κ B
NK-celler	Naturlige dreperceller
NSAIDs	Ikke-steroide antiinflammatoriske midler
OUS	Oslo universitetssykehus
PCR	Polymerasekjedereaksjon
P-gp	P-glykoprotein; P-gp; ABCB1
PKC	Protein kinase C
POR	P450 oksidoreduktase
PPARA	Peroksisom proliferatoraktivert reseptor-alfa
PRA	Panelreaktive antistoff
PMA	Forbol 12-myristat 13-acetat
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RGE	Restgenekspresjon
RPL13A	Ribosomal protein L13a
Tx	Transplantasjon

1 Innledning

1.1 Organtransplantasjon

Transplantasjon betyr overføring av celler, vev eller organer. Overføringen kan skje innen samme individ eller fra et individ til et annet. En transplantasjon mellom to genetisk ulike individer fra samme art kalles allogene transplantasjon. Ved allogene transplantasjoner vil genetiske forskjeller mellom donor og resipient føre til en immunrespons mot transplantatet, hovedsakelig på grunn av ulik vevstype. Ukjente vevstypemolekyler på transplantert vev eller organ vil av resipientens immunsystem oppfattes som antigener, og føre til en avstøtningsreaksjon og tap av graft. Dette var lenge et hinder for utviklingen av kliniske transplantasjoner. Den første vellykkede allogene organtransplantasjonen ble gjennomført mellom to eneggede tvillinger i Boston i 1954. Siden eneggede tvillinger er genetisk like unngikk de problemet med immunrespons mot det transplanterte organet. Allerede to år senere, i 1956, ble det gjennomført en nyretransplantasjon mellom to ubeslektede personer ved Rikshospitalet i Norge. Til tross for at immunosupprimerende behandling kun besto av helkroppsbestråling og kortison, levde pasienten i 30 dager med den nye nyren (1). Fra midten av 1900-tallet og fram til i dag har organtransplantasjon gått fra å være en eksperimentell prosedyre til å bli et førstevalg og etablert behandlingstilbud til pasienter med terminal organsvikt. Vevstyping, forbedring av operasjonsteknikker og introduksjon av meget effektive immunosupprimerende legemidler har bidratt til at transplantasjon i dag gir svært gode resultater. Alle organtransplantasjoner i Norge utføres ved Oslo universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet, og i 2012 ble det utført 487 transplantasjoner (2).

1.1.1 Nyretransplantasjon

Nyre er det organet som hyppigst blir transplantert, og i 2012 ble det utført 299 nyretransplantasjoner ved Rikshospitalet (2). Hovedårsaken til at det utføres så mange flere nyretransplantasjoner enn transplantasjoner av andre organer, er muligheten til å bruke levende donor. Siden nyretransplantasjonsprogrammet ble etablert i 1969, har 40 % av transplantasjonene blitt utført med nyre fra levende donor, og Norge er et av landene i verden som utfører flest transplantasjoner med nyre fra levende donor (3).

De siste ti årene har antall nyretransplantasjoner økt, hovedsakelig på grunn av økt donasjon fra døde. I 2012 var andelen levende donorer 27 % (4). Antallet levende donorer holder seg imidlertid stabilt, noe som har ført til at ventetiden på nyretransplantasjon er relativt kort. Ved utgangene av 2011 var median tid på venteliste 7 måneder (4). Fra 2000 til 2010 var 5-års pasientoverlevelse ved nyretransplantasjon i Norge 93 % ved levende donor og 80 % fra død donor, mens 5-års graftoverlevelse for samme periode var på henholdsvis 87 % og 74 % (3).

1.2 Avstøtningsreaksjon

En allogen organtransplantasjon fører vanligvis til en avstøtningsreaksjon, eller reaksjon.

Dette er kroppens måte på å forsvare seg mot noe den oppfatter som fremmed. På et transplantert organ uttrykkes det proteiner som vanligvis er ulike fra mottakerens.

Immunceller hos mottakeren vil gjenkjenne disse alloantigenene som fremmede og dermed sette i gang en reaksjon av det transplanterte organet.

1.2.1 Humane leukocyt-antigener

De vanligste alloantigenene som setter i gang en reaksjonsreaksjon er hovedhistokompatibilitetskompleks (MHC)-antigener, som hos mennesker kalles humane leukocyt-antigener (HLA). Hovedfunksjonen til HLA-molekylene er å presentere peptidantigener til T-lymfocytter. På denne måten kan T-lymfocytene overvåke det intra- og ekstracellulære miljøet, og sette i gang en immunrespons ved tilstedeværelse av fremmede peptider. For å øke effektiviteten av antigenpresentasjon, uttrykker cellene mange ulike former av HLA-molekyler med ulik spesifisitet for peptidbinding.

HLA-molekylene som er involvert i antigenpresentasjon deles inn i to familier, HLA klasse I og HLA klasse II. HLA-klasse I-molekylene består av en membranbundet alfa-kjede som er assosiert med beta-2-mikroglobulin. HLA klasse II-molekylene består av to membranbundne peptider, en alfa- og en beta-kjede. Alfa- og beta-kjedene er kodet av polymorfe gener som ligger tett sammen på kromosom 6. Beta-2-mikroglobulin er kodet av et gen på kromosom 15.

HLA-klasse I-molekylene er uttrykt på de fleste celler i kroppen, og presenterer peptider fra proteiner i cellens cytoplasma til CD8 ("cluster of differentiation" eller differensieringsantigen)-positive T-lymfocytter. HLA-klasse II-molekylene uttrykkes primært

på antigenpresenterende celler, og presenterer peptider fra proteiner som er tatt opp i cellen ved endocytose til CD4-positive T-lymfocytter. Hvert individ uttrykker tre klassiske HLA-klasse I-molekyler, HLA-A, HLA-B og HLA-C, og tre klasse II-molekyler, HLA-DR, HLA-DQ og HLA-DP. De tre HLA-klasse I-molekylene kodes av tre separate gener, mens hvert av HLA-klasse II-molekylene er produkt av to eller flere HLA-gener (alfa- og betakjeder). De fleste HLA-genene er svært polymorfe med et stort antall alleler for hvert gen. Dette innebærer at sannsynligheten er stor for at individer er heterozygote for HLA-genvarianter, og dermed har mulighet til presentere en stor variasjon av peptidantigener.

Polymorfien i HLA-genene er hovedårsaken til reaksjon av transplanterte organer. Når donor og resipient har ulik HLA-type, kan det føre til en kraftig immunrespons hos resipienten mot donorens HLA-molekyler som oppfattes som fremmede. HLA-matching er derfor et viktig verktøy for å finne en donor som er mest mulig vevstypesforlikelig med mottakeren.

Klasse I-isotypene HLA-A og HLA-B og klasse II-isotype HLA-DR er de mest immunogene HLA-molekylene. Uforlikelighet mellom disse molekylene, spesielt HLA-DR, har vist negativ effekt på graftoverlevelse (5-7). Det tilstrebes derfor så høy grad av vevstypesforlikelighet (HLA-A, HLA-B og HLA-DR) som mulig mellom donor og mottaker. Immunogene forskjeller innen en familie er mindre enn ved ubeslektet donor/mottaker-forhold, og sjansen for å finne en donor med gunstig HLA-match i familien er større (8). Søskene har 25 % sjans for å være HLA-identiske ved at de arver samme HLA-haplotyper fra sine foreldre. I slike tilfeller reduseres sjansen for akutt reaksjon, som igjen har positiv effekt på langtidsresultatet etter transplantasjon (9). Ved HLA-identisk donor/mottaker-forhold, dvs. identitet ved alle testede loci, vil også immunsuppresjonen kunne reduseres. Vanligvis følges et immunosupprimerende regime uten mykofenolat, som ellers er et sentralt legemiddel etter nyretransplantasjon (10) (se avsnitt 1.3).

1.2.2 Reaksjonstyper

Reaksjonsreaksjoner deles vanligvis inn i tre kategorier avhengig av når den inntreffer og hvilke mekanismer som er involvert.

Hyperakutt reaksjon er en irreversibel antistoffmediert reaksjon som vanligvis inntreffer minutter eller timer etter transplantasjon. Dette oppstår når det finnes sirkulerende anti-donor antistoff hos mottakeren som er rettet mot fremmede HLA-molekyler eller ABO-

blodtypeantigener. Det finnes ingen behandling, og hyperakutt reaksjon resulterer vanligvis i tap av graftet. For å unngå denne typen avstøtning, gjøres det en crossmatch-test på forhånd som tester forlikelighet mellom serum fra mottaker og lymfocytter fra donor. Bruk av crossmatch-test før transplantasjon har ført til at forekomsten av hyperakutt reaksjon svært lav.

Akutt reaksjon oppstår ofte i løpet av de første dagene eller ukene etter transplantasjon, som regel innen de tre første månedene. Det er to hovedkategorier av akutt reaksjon, cellemediert og antistoffmediert, selv om disse to overlapper noe. De to reaksjonstypene kan skilles fra hverandre vha. biopsi. Ved cellulær reaksjon er det alloreaktive T-lymfocytter som angriper HLA-molekyler på graftet, og biopsi domineres av lymfocytinfiltrater i interstitiet, tubuli og arterier. Akutt antistoffmediert reaksjon er dominert av vaskulære skader, tilstedeværelse av C4d-komplementfaktor og sirkulerende antistoffer (11). En akutt reaksjon kan unngås ved tilstrekkelig immunsupprimerende behandling sammen med høy grad av HLA-forlikelighet. Ved en reaksjonsepisode må det igangsettes behandling (se avsnitt 1.3.2).

Kronisk avstøtning er dårligere kartlagt og vanskeligere å behandle enn akutt reaksjon. Avstøtningen oppstår måneder eller år etter transplantasjon, hvor gradvis fortykning av blodårevegger og innsnevring av lumen fører til utilstrekkelig blodforsyning, som igjen vil lede til iskemi og tap av graftfunksjon (8). Økt serumkreatinin, nedsatt glomerulær filtrasjonshastighet (GFR), proteinuri og hypertensjon kan oppstå 3-6 måneder etter transplantasjon og er kliniske tegn på kronisk allograftdysfunksjon (12,13). En biopsi ved kronisk allograftdysfunksjon vil vise interstitiell fibrose og tubulær atrofi som er tilstander som til slutt vil føre til ødeleggelse av graftet. Interstitiell fibrose og tubulær atrofi kan oppstå som følge av immunologisk skade og/eller ikke-immunologisk skade (f.eks. legemiddelindusert nyretoksisitet) (12).

1.2.3 ABO-antigener

ABO-antigener er sukkerkjeder som er uttrykt på røde blodceller, endotelceller og epitelceller i mange organer. Sukkerkjedene finnes som variantene A, B og O, og ulike genkombinasjoner gir opphav til blodtypene A, B, O og AB. I tidlig levealder blir det dannet ABO-antistoffer mot ABO-antigener som mangler, dvs. at individer med blodtype A danner antistoffer mot B-antigen og omvendt. På grunn av dette vil transplantasjon mellom ABO-uforlikelig donor og mottaker uten behandling, føre til hyperakutt reaksjon. Når antistoffene bindes til

endotelcellene, startes komplement- og koagulasjonskaskader, og blodårer i graftet okkluderes.

Ved transplantasjon av nyre fra avdød giver kreves det ABO-forlikelighet etter gjeldende protokoll ved OUS, Rikshospitalet. Ved bruk av levende giver kan ABO-uforlikelighet vurderes dersom det ikke finnes forlikelig levende giver. Det gis da ekstra behandling før transplantasjon for å fjerne eksisterende antistoffer og hindre nydanning av antistoffer.

1.2.4 Sensibilisering

Pasienter kan sensibiliseres og danne antistoff mot HLA-antigener i forbindelse med tidligere graviditet, blodtransfusjon eller organtransplantasjoner. Sensibiliseringen øker sannsynligheten for at mottakeren har preformerte sirkulerende antistoff mot HLA-molekylene til en potensiell donor, og sjansen for å finne en donornyre med negativ crossmatch vil dermed være mindre. Nivå av sensibilisering bestemmes ved analyse av panelreaktive antistoffer (PRA). Dette innebærer at pasientens serum testes mot lymfocytter fra et panel med donorer som representerer de vanligste HLA-allotypene i befolkningen. Andelen positive reaksjoner rapporteres som en relativ PRA-verdi, og pasienter med PRA over 5 % blir klassifisert som sensibiliserte. Pasienter med $PRA \geq 85\%$ defineres i følge den europeiske samarbeidsorganisasjonen Eurotransplant, som sterkt sensibiliserte (14). Siden sjansen for å finne en donormatch til en sensibilisert pasient er mindre, blir disse pasientene prioritert på ventelisten. Tilstedeværelse av donorspesifikke antistoff øker risikoen for hyperakutt og akutt reaksjon, og bør helst unngås. Dette må i hvert enkelt tilfelle vurderes i forhold til nivå av donorspesifikke antistoff, mulighet til å finne nyre uten donorspesifikke antistoff og tid på venteliste. Ved transplantasjon får sensibiliserte pasienter med høy risiko standard kvadrupel immunsuppresjon med forhøyet glukokortikoid- og CNI-dosering, i tillegg til monoklonalt antistoff (rituximab) og polyklonalt antistoff (Octagam®/Kiovig®). Pasientene blir vurdert individuelt ut i fra immunologisk utredning og klinisk risiko.

1.3 Immunsuppressiv behandling

Den kraftige immunresponsen som settes i gang ved en allotransplantasjon, gjør det nødvendig å bruke immunsupprimerende legemidler for å unngå reaksjon av det

transplanterte organet. Behandlingen består av en kombinasjon av flere typer immunsuppressive legemidler med ulike virkningsmekanismer. På denne måten kan man oppnå synergistisk immundempende effekt samtidig som doseavhengig toksisitet av hvert enkelt legemiddel reduseres. Flere av de immunsupprimerende legemidlene har et smalt terapeutisk vindu, og det er viktig å finne en balanse mellom for lite immunsuppresjon som kan føre til avstøtning, og for kraftig immunsuppresjon som øker risiko for infeksjoner, malignitet og legemiddelspesifikke bivirkninger. Risikoen for en akutt reaksjon er størst i den tidlige fasen etter transplantasjon, og det blir derfor gitt mer intens immunsuppresjon med induksjonsbehandling i denne fasen, før legemiddeldoseringen trappes gradvis ned til et vedlikeholdsnivå i løpet av de første seks månedene etter transplantasjon (10). Vedlikeholdsbehandlingen må fortsette livet ut.

I Norge består det immundempende regimet ved nyretransplantasjon vanligvis av kvadrupelbehandling med en kalsineurinhemmer (CNI: takrolimus eller ciklosporin), mykofenolat, glukokortikoid og induksjonsbehandling med monoklonalt antistoff (basiliximab) (10). I enkelte tilfeller, som f.eks. ved tidligere malign sykdom eller CNI-toksisitet, blir CNI eller mykofenolat erstattet av mTOR (mechanistic target of rapamycin)-hemmerene sirolimus eller everolimus.

Mykofenolat mofetil administreres i doser på 0,75 g eller 1 g to ganger daglig avhengig av kombinasjon med henholdsvis takrolimus eller ciklosporin (CsA) (10). Mykofenolat hemmer celledelingen ved å hemme enzymet inosinmonofosfatdehydrogenase (IMPDH), som er viktig for nysyntesen av guaninnukleotider. Denne nysynteseveien er spesielt viktig for proliferasjon og klon ekspansjon av T- og B-lymfocytter. Siden andre celletyper i større grad kan utnytte andre synteseveier, er effekten av mykofenolat relativt spesifikk på lymfocytter (15). I tillegg virker mykofenolat ved å blokkere antistoffproduksjon og å nedsette generering av cytotoksiske naturlige dreper (NK)-celler og forsinket hypersensitivitetsreaksjon (16).

Glukokortikoider gis som induksjonsbehandling intravenøst i løpet av transplantasjonsdagen (metylprednisolon 250 mg), fulgt av peroral vedlikeholdsbehandling med prednisolon som gradvis trappes ned fra 20 mg til 5 mg. Hos utvalgte pasienter vurderes seponering av prednisolon etter 12 måneder (10). Glukokortikoider har uspesifikke antiinflammatoriske effekter, og virker bl.a. ved å diffundere gjennom cellemembranen der de bindes til glukokortikoidreseptorer. Dette komplekset kan enten hemme transkripsjonsfaktoren NF- κ B (nukleærfaktor- κ B) i cytosol, som er ansvarlig for transkripsjonen av en rekke

proinflammatoriske cytokiner, eller selv passere inn i cellekjernen og sette i gang en oppregulering av transkripsjonen av antiinflammatoriske cytokiner. I tillegg hemmer glukokortikoider inflammatorisk celle migrasjon til inflammasjonssted, og fører til apoptose av leukocytter. På grunn av glukokortikoider sine mange effekter på genekspressjon og cellulær metabolisme, har de også mange uheldige bivirkninger, som for eksempel væskeretensjon, vektøkning, diabetes, tap av benmineral og tynnere hud (8).

Everolimus og sirolimus er makrolidantibiotika som er strukturelt beslektet med takrolimus og som i likhet med takrolimus, bindes til FK506-bindende protein (FKBP). Komplekset binder derimot ikke til kalsineurin, men til kinasen mTOR, og hindrer dermed signaloverføringen fra interleukin-2 (IL-2)-reseptoren slik at T-lymfocytproliferasjonen undertrykkes (8,16). Flere studier har vist at mTOR-hemmere ikke kan erstatte CNI i den tidligste fasen etter transplantasjon på grunn av lavere effektivitet og en mindre gunstig bivirkningsprofil, noe som begrenser bruken (17-19). De vanligste bivirkningene til mTOR-hemmerene er hyperlipedemi, trombocytopeni og svekket sårheling (17). Sammenlignet med CNI er mTOR-hemmerene mindre nyretoksiske, og kan dermed bidra til å bevare eller bedre nyrefunksjonen (20,21). I tillegg har mTOR-hemmerene antiproliferative egenskaper, og brukes derfor ofte som et alternativ til CNI ved malign sykdom både før og etter transplantasjonen (10).

Basiliximab er et monoklonalt antistoff som gis som standard induksjonsbehandling. Det gis intravenøst, én dose før operasjon og én dose fire dager etter transplantasjon (10). Basiliximab virker ved å binde seg til IL-2-reseptor på T-lymfocytter, slik at T-lymfocytproliferasjonen hemmes. Bruk av IL-2-reseptorantistoff i tillegg til standard immunsupprimerende legemiddelterapi, har vist seg å redusere forekomsten av akutt reaksjon det første året (22).

CNI revolusjonerte den immunsupprimerende behandlingen da de kom på markedet, først CsA i 1983 og deretter takrolimus i 1994. Insidensen av akutte reaksjoner gikk kraftig ned, og graftoverlevelsen på kort sikt forbedret seg signifikant (23). Til tross for dette har det ikke skjedd noen tilsvarende forbedring av langtidsoverlevelsen (>1 år) (24).

Hovedutfordringen med bruk av CNI i dag er at langtidsbruk er assosiert med en rekke alvorlige bivirkninger, spesielt nyretoksisitet som over tid vil ha negativ effekt på nyrefunksjon (25). I tillegg kan CNI-behandling forårsake hypertensjon, hyperlipidemi og diabetes mellitus, og kardiovaskulær sykdom er den vanligste dødsårsaken hos nyretransplanterte pasienter (26). På grunn av dette er det gjort en rekke studier på alternative

immunsupprimerende regimer hvor CNI enten er utelatt, gitt i lavere doser eller seponert etter en viss tid. Resultatene fra studier med immundempende regimer uten CNI har så langt vært skuffende, og flere av studiene har vist høyere forekomst av akutt reaksjon (27). I 2011 ble belatacept markedsført som et alternativ til CNI i immundempende regimer etter nyretransplantasjon. Belatacept er et CTLA-4-IgG-fusjonsprotein som binder seg til CD80 og CD86 på antigenpresenterende celler og blokkerer kostimuleringen av T-lymfocytter. Tidlige studier viste at belatacept var like effektivt til å forhindre akutt reaksjon samtidig som det var mindre nyretoksisk sammenlignet med CsA (28). Langtidsdata i nyre studier har derimot rapportert om hyppigere tilfeller av akutt reaksjon sammenlignet med CsA, men det er vist tendens til bedret langtidsoverlevelse og mindre dannelse av donorspesifikke antistoff (29). Nylig kom Statens legemiddelverk med en advarsel om økt frekvens av akutt avstøtning ved bruk av belatacept når dosen kortikosteroider trappes raskt ned hos pasienter med høy immunologisk risiko for akutt avstøtning (30). Det jobbes kontinuerlig for mer informasjon og flere studier på dette området, men foreløpig er CNI en viktig del av det immunsupprimerende regimet. De siste årene har det terapeutiske konsentrasjonsområdet for CNI blitt redusert, etter at studier har vist at immunsupprimerende regimer med lavere CNI-doser, bedrer nyrefunksjonen og har like god effektivitet (31).

Etter at takrolimus kom på markedet, har bruken gradvis tatt over for CsA. Takrolimus har i en metaanalyse vist en signifikant reduksjon av akutt reaksjon det første året etter transplantasjon sammenlignet med CsA (32). Selv om analysen ikke viste forskjell for graft- og/eller pasientoverlevelse, har episoder med akutt reaksjon vist signifikant sammenheng med dårligere graftoverlevelse (33). Dette har ført til at takrolimus i dag stort sett er den foretrukne CNI. CsA blir imidlertid vurdert i enkelte tilfeller på grunn av ulik bivirkningsprofil. Blant annet er takrolimus assosiert med en høyere risiko for å utvikle diabetes mellitus etter transplantasjon (15). Ved OUS, Rikshospitalet er takrolimus i dag standard CNI-behandling, med unntak av pasienter med nedsatt glukoseintoleranse som får CsA (10).

1.3.1 Takrolimus

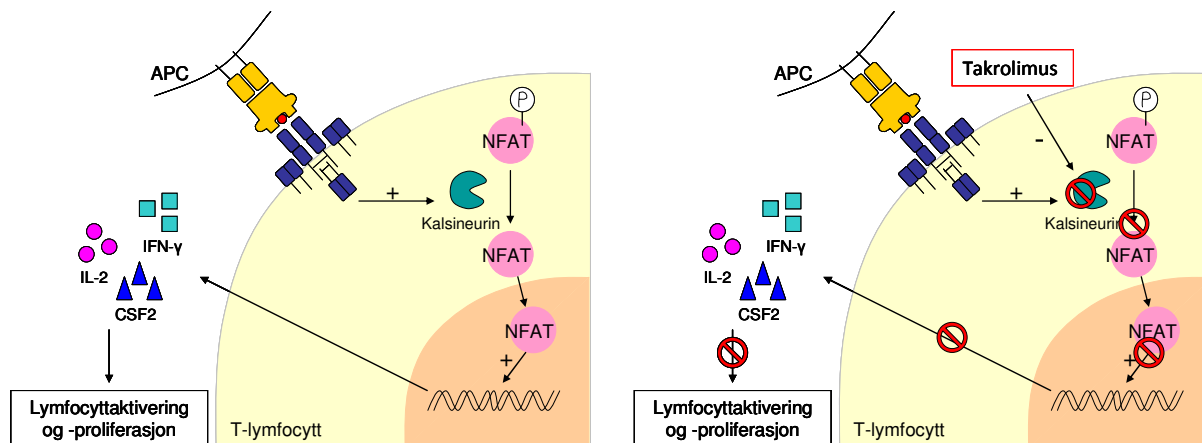
Takrolimus, også kalt FK506, er et makrolidantibiotikum isolert fra soppen *Streptomyces tsukubaensis*. Substansen ble oppdaget av Fujisawa Pharmaceutical Company i 1984 i en jordprøve fra Mount Tsukuba i Japan. Den immunsupprimerende effekten til takrolimus ble

første gang beskrevet i 1987 (34). Meningene var delte rundt det nye potensielle legemiddelet, og det var bekymring rundt de toksiske effektene. Takrolimus ble derfor aldri testet ut på friske frivillige, men ble i 1989 for første gang gitt til alvorlig syke pasienter som opplevde reaksjon av organ til tross for standard immundempende terapi (35). Takrolimus ble godkjent av FDA ("Food and Drug Administration") i 1994 under navnet Prograf® som forebyggende behandling mot reaksjon etter levertransplantasjon. Da hadde allerede CsA vært på markedet noen år og vist en kraftig forbedring i den immunsupprimerende behandlingen med færre tilfeller av akutt reaksjon og økt graftoverlevelse (36).

Takrolimus markedsføres i dag fortsatt under navnet Prograf® (Astellas) med dosering to ganger daglig, med en startdose på 0,04 mg/kg. Indikasjon er profylakse mot avstøtning av transplantat ved allogen lever-, nyre-, eller hjertetransplantasjon, og behandling av avstøtning av allograft ved resistens mot andre immunsuppressive midler (37). Det har også kommet en depotformulering på markedet, under navnet Advagraf® (Astellas), som doseres én gang daglig. Før utskrivning fra sykehuset ca. ti uker etter transplantasjon, går en del pasienter over til depottabletter for å lette dosering og for enklere å oppnå en jevn legemiddelkonsentrasjon i kroppen.

Farmakodynamikk

Immunaktivering vil normalt føre til at T-lymfocytreseptoren sender et signal inn i cellen som fører til aktivering og økt syntese av transkripsjonsfaktoren AP-1 (aktivatorprotein-1), i tillegg til hydrolyse av membranlipider som gir økt intracellulær kalsium (Ca^{2+})-konsentrasjon. Ca^{2+} binder seg til fosfatasen kalsineurin som aktiveres og defosforilerer transkripsjonsfaktoren NFAT ("nuclear factor of activated T-cells"). NFAT kan dermed entre cellekjernen hvor den bindes til AP-1 og danner et kompleks. Dette komplekset kan indusere transkripsjonen av gener som er viktige for T-lymfocytaktivering og -proliferasjon (8). Takrolimus virker ved å binde seg til immunofilinet FKBP i cytosol. FKBP har prolyl-peptidyl isomerase-aktivitet som hemmes ved binding av takrolimus. Hemming av denne aktiviteten er nødvendig, men ikke nok til å gi den immunsupprimerende effekten. FKBP-takrolimus-komplekset som dannes, binder seg og hemmer aktiviteten til kalsineurin, slik at NFAT ikke kan entre cellekjernen. Dermed vil gentranskripsjonen av IL-2 og andre cytokiner som er viktige for T-lymfocytaktiveringen, bli hemmet (Figur 1) (38).



Figur 1 Virkningsmekanisme takrolimus.

APC, antigenpresenterende celle; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; IL2, interleukin 2; IFNG, interferon gamma; CSF2, kolonistimulerende faktor 2.

Farmakokinetikk

Takrolimus kan absorberes gjennom hele mage-tarmkanalen, og biotilgjengeligheten etter peroral dosering er ca. 20-25 %. Maksimal plasmakonsentrasjon oppnås vanligvis 1-3 timer etter doseinntak. Noen pasienter har kontinuerlig absorpsjon over lengre tid som gir en relativt flat absorpsjonsprofil. Absorpsjonen av takrolimus påvirkes av samtidig inntak av mat, spesielt fettrik mat, som reduserer både absorpsjonshastigheten og -graden (37,38). Studier har vist en reduksjon i arealet under tids-konsentrasjonskurven (AUC) mellom 27-37 % ved samtidig inntak av fettrik mat (39). I tarmen blir takrolimus utsatt for metabolisme av en rekke enzymer i tillegg til at molekylet er substrat for P-glykoprotein (P-gp, ABCB1)-mediert effluks.

Takrolimus bindes sterkt til erythrocytter i blodet, og har et distribusjonsforhold mellom fullblod- og plasmakonsentrasjoner på ca. 20:1. I plasma er takrolimus 98,8 % bundet til plasmaproteiner, hovedsakelig albumin og alfa-1-surt glykoprotein. På grunn av den sterke bindingen til erythrocytter og plasmaproteiner, er det kun en liten andel takrolimus som er ubundet og kan distribueres til vev. Siden takrolimus er svært lipofil, er distribusjonen i kroppen likevel ustrakt (37,38).

Takrolimus metaboliseres hovedsakelig av cytokrom P-450 (CYP)-enzymene CYP3A4 og CYP3A5 i lever, men det skjer også betydelig metabolisme i tarmveggen (40). Uttrykket av CYP3A5-enzymet er i stor grad genetisk betinget (41). Blant individer som uttrykker

funksjonelt CYP3A5-enzym metaboliseres takrolimus i størst grad via CYP3A5 (40,42). For pasienter som mangler funksjonelt CYP3A5-enzym, metaboliseres takrolimus hovedsakelig av CYP3A4. Takrolimus blir demetylert og hydroksylert, og det er foreløpig funnet flere metabolitter. Én metabolitt har vist samme immunsupprimerende aktivitet som takrolimus *in vitro*, mens de andre kun har svak eller ingen immunsupprimerende aktivitet (43).

Takrolimus elimineres hovedsakelig via gallen, bare 2 % elimineres via urin, og mindre enn 1 % elimineres uforandret (43).

Interaksjoner

Interaksjoner med takrolimus kan kategoriseres i to grupper; de som påvirker farmakokinetikk og de som påvirker farmakodynamikk.

Farmakokinetiske interaksjoner oppstår som regel som følge av legemidler eller andre substanser som induserer eller hemmer CYP3A-isoenzymer i tarmepitel eller lever. Substanser som induserer CYP3A-metabolismen, fører til nedsatt oral biotilgjengelighet og/eller økt hepatisk clearance av takrolimus. Eksempel på induktorer er rifampicin, fenytoin og prikkperikum (*Hypericum perforatum*). Substanser som hemmer CYP3A-enzymene øker oral biotilgjengelighet og/eller nedsatt hepatisk clearance. Eksempel på sterke CYP3A-hemmere er en rekke antimykotiske midler, erytromycin og HIV-proteasehemmere. Grapefruktjuice er eksempel på en matvare som hemmer CYP3A. Med unntak av klinisk bruk for å nå legemiddelkonsentrasjon, bør juicen unngås ved bruk av legemidler som er CYP3A-substrater (38,43). I tillegg til substanser som påvirker metabolismen av CYP3A, vil hemmere av P-gp, som pumper legemiddel ut i fra tarmepitel, kunne føre til en økt konsentrasjon av takrolimus.

Farmakodynamiske interaksjoner med takrolimus inkluderer substanser som gjennom additive eller synergistiske effekter påvirker toksisitet og effektivitet. Spesielt gjelder det andre potensielt nyretoksiske legemidler, som ikke-steroide antiinflammatoriske midler (NSAID), aminoglykosider, CsA og amfotericin B, som kan forsterke eller øke risiko for nyretoksitet. Andre farmakodynamiske interaksjoner er kombinasjon med legemidler som potensielt kan øke de toksiske egenskapene til takrolimus. Dette gjelder legemidler som er potensielt nevrotoksiske, kortikosteroider som kan gi økt glukoseintoleranse, og mykofenolat som kan forsterke gastrointestinal toksisitet (43).

1.3.2 Rejeksjonsbehandling

Ved en akutt rejeksjon gis det metylprednisolon 500 + 250 + 250 + 250 mg intravenøst hhv. dag 1, 2, 3 og 4. Ved behandling etter dag 4 gis det glukokortikoid 30 mg peroralt i 14 dager før gradvis nedtrapping til standard protokoll (10). Ofte gis det også økt CNI-dose. I noen tilfeller, som ved glukokortikoidresistent og antistoffmediert rejeksjon, gis behandling med antitymocyttglobulin (ATG) i tillegg.

1.3.3 Infeksjoner og profylaktisk behandling

Bruken av CNI har ført til økt graftoverlevelse og færre tilfeller av akutte rejeksjoner, men ulempen med effektiv immunsuppressiv behandling er bl.a. økt risiko for infeksjoner. Den første måneden etter transplantasjon er de vanligste infeksjonene infeksjoner overført fra donor, sykehusinfeksjoner eller reaktivering av pre-transplantasjonspatogener. I tidsrommet 1-6 måneder etter transplantasjon er opportunistiske infeksjoner vanligst. Etter seks måneder dominerer generelle patogener, som fører til infeksjoner som lungebetennelse og urinveisinfeksjon (44).

Cytomegalovirus (CMV)-infeksjon er en av de vanligste virale komplikasjonene etter organtransplantasjon. CMV er et virus i herpesgruppen som ligger latent i kroppen hos over halvparten av befolkningen, og kan gi alvorlige infeksjoner hos personer med nedsatt immunforsvar. Pasienter testes for CMV-IgG før transplantasjon. En pasient uten CMV-IgG-antistoffer som mottar en nyre fra en donor med latent CMV, kan få en primærinfeksjon som vanligvis er mer kritisk enn en reaktivering av CMV-infeksjon. Ved transplantasjon fra CMV-positiv donor til CMV-negativ mottaker skal mottaker ha profylakse med valganciklovir de første seks månedene etter transplantasjon i henhold til protokoll (10). Hos øvrige pasienter blir det ved Rikshospitalet gjennomført ukentlig monitorering av virustiter i blod vha. kvantitativ PCR (polymerasekjedereaksjon).

Polyomavirus gir vanligvis en asymptomatisk virusinfeksjon som rammer over halvparten av befolkningen i løpet av barndommen. Virusinfeksjonen kan bli reaktivert ved tilstander som nedsetter immunforsvaret, og er en vanlig komplikasjon etter transplantasjon. Det finnes to humane polyomavirus; BK-virus er assosiert med nefropati og obstruksjon av urinleder hos transplanterte pasienter, mens JC-virus er assosiert med progressiv multifokal

leukoencefalopati (44). Det finnes ingen effektiv antiviral behandling av polyomavirus, og terapi består i reduksjon av immunsuppresjon.

Mikroorganismen *Pneumocystis jiroveci*, er en viktig årsak til opportunistiske infeksjoner hos personer med svekket immunforsvar. Alle transplanterte pasienter får derfor forebyggende behandling med trimetoprim-sulfametoksazol fra første dag etter transplantasjon.

1.4 Individualisert kalsineurinhemmerbehandling

CNI har et smalt terapeutisk vindu og variabel farmakokinetikk. Det er derfor viktig å finne en balansegang mellom for svak immunsuppresjon som øker risiko for rejeksjon, og for kraftig immunsuppresjon som kan gi økt toksisitet og legemiddelspesifikke bivirkninger. De fleste av CNI-bivirkningene er doseavhengige, og optimalisering av dosering kan være en potensiell strategi for å bedre langtidsresultatene etter transplantasjon. I dag blir CNI-doseringen vanligvis individualisert basert på farmakokinetiske målinger. Til tross for dette er CNI-behandling assosiert med nyretoksitet og bivirkninger som bidrar til økt risiko for kardiovaskulære hendelser og malignitet. Ytterligere optimalisering av CNI-dosering kan være en potensiell strategi for å bedre langtidsresultatene etter transplantasjon.

1.4.1 Farmakokinetisk monitorering

Det beste målet for legemiddeleksponering er AUC og studier har vist sammenheng mellom AUC og kliniske utfall i form av nyretoksitet og akutt rejeksjon (45). AUC er imidlertid et upraktisk og tidkrevende mål som er lite egnet for daglig rutine. I dag baseres CNI-behandlingen hovedsaklig på legemiddelkonsentrasjonen i fullblod målt før dose (C_0). I henhold til Rikshospitalets protokoll doseres takrolimus for å oppnå en konsentrasjon pre-dose mellom 3-7 $\mu\text{g/L}$ de seks første månedene, deretter mellom 3-5 $\mu\text{g/L}$ (10). CsA monitoreres ved måling av legemiddelkonsentrasjonen to timer etter dose (C_2) de første to månedene, og deretter ved C_0 . Det terapeutiske området reduseres gradvis fra CsA C_0 200-300 $\mu\text{g/L}$ til 75-125 $\mu\text{g/L}$ seks måneder etter transplantasjon. C_0 er rapportert å korrelere dårlig med AUC (46), og måling av maksimal blodkonsentrasjon (C_{maks} : $C_{1,5}$ for takrolimus og C_2 for CsA) har i noen studier vist seg å bedre predikere AUC sammenlignet med C_0 (46,47).

Målinger ved bestemte tidspunkter er imidlertid et mer upraktisk mål med smalere vindu for prøvetaking (48).

Etter en transplantasjon er det svært viktig å oppnå terapeutisk område for CNI så raskt som mulig. Fordi det tar tid å nå likevektskonsentrasjon etter legemiddeloppstart, vil konsentrasjonsmålinger ha begrenset verdi de første dagene etter oppstart når risikoen for rejeksjon er størst (49).

Monitorering basert på farmakokinetiske data reflekterer ikke nødvendigvis den biologiske effekten CNI har på immunsystemet. Samme legemiddelkonsentrasjon kan gi store forskjeller i farmakodynamisk respons mellom individer (50). Pga. begrensningene med konsentrasjonsmålinger er det ønskelig med flere eller alternative metoder for ytterligere individualisering av CNI-dosering hos nyretransplanterte pasienter.

1.4.2 Farmakogenetiske analyser

Takrolimus og CsA metaboliseres av CYP3A-enzymet i tillegg til å være et substrat for P-gp (se avsnitt 1.3.1). Individuelle forskjeller i CNI-farmakokinetikk er sett i sammenheng med individuell ekspresjon og aktivitet av P-gp og CYP3A-enzymet (51).

Uttrykket av CYP3A5-enzymet er i stor grad genetisk betinget. Det vanligste *CYP3A5*-allelet blant kaukasere er *CYP3A5*3* med en allelfrekvens på ca. 85-95 %. Allelet karakteriseres av en enkelt nukleotidsubstitusjon i posisjon c.219-237A>G (jf. NM_000777.3, rs776746) i intron 3 i *CYP3A5*-genet. Sekvensvarianten gir en spleisedefekt og svært lavt eller manglende uttrykk av funksjonelt CYP3A5-protein. Individer som er homozygote for *3-allelet, har dermed svært redusert eller manglende CYP3A5-aktivitet, mens bærere av minst ett *1-allel uttrykker funksjonelt CYP3A5-enzym (40). Blant kaukasere er 60-90 % homozygote for *CYP3A5*3* og uttrykker dermed ikke CYP3A5-enzymet (52). Pasienter uten CYP3A5-uttrykk vil ha nedsatt metabolisme av takrolimus, og flere studier har rapportert sammenheng mellom *CYP3A5*-genotype og takrolimus dosebehov (41). Hos pasienter som uttrykker CYP3A5 er det sett behov for mer enn dobling av takrolimusdose sammenlignet med pasienter som ikke uttrykker enzymet (49). Det er imidlertid ikke sett signifikant sammenheng med CYP3A5-genotype og CsA dosebehov (51).

Variasjonen i CYP3A4-enzymaktivitet mellom ulike individer er svært stor (53). Aktiviteten til CYP3A4 er i stor grad påvirket av miljøfaktorer som kosthold, røyking og naturmidler. Komedisinering kan føre til en rekke legemiddelinteraksjoner mellom substrater for CYP3A4 som skyldes substanser som enten hemmer eller induserer enzymaktiviteten (53). Det har nylig blitt beskrevet at *CYP3A4**22-allelet, karakterisert av enkelt nukleotidsubstitusjonen c.522-191C>T (jf. NM_001202855.2, rs35599367) i intron 6, gir nedsatt CYP3A4-aktivitet og kan bidra til å forklare noe av den store variabiliteten av CYP3A4-aktiviteten i befolkningen (54). Studier har vist at pasienter som er heterozygote for *CYP3A4**22-allelet, har lavere CNI-dosebehov (42,55).

Flere andre genvarianter er rapportert å være relevante i forhold til CNI. Enzymet P450 oksidoreduktase (POR) overfører elektroner fra NADPH over til CYP-enzymet slik at de kan utøve sin aktivitet. Nylig har en enkelt nukleotidsubstitusjon, c.1508C>T (jf. NM_000941.2, *POR**28; rs1057868) i *POR*-genet blitt assosiert med økt CYP3A-aktivitet *in vivo*, noe som igjen kan føre til et høyere CNI-dosebehov (56). Det har også blitt rapportert at CYP3A-enzymaktivitet er påvirket av genvarianter av peroksisom proliferatoraktivert reseptor-alfa (*PPARA*), som koder for kjernereseptor PPAR-alfa (57). Transportproteinet P-gp er involvert i transport av både takrolimus og CsA og transportaktiviteten kan påvirke biotilgjengeligheten av disse legemidlene. Individuelle forskjeller i P-gp-aktivitet er sett i sammenheng med blant annet genetisk variabilitet i *ABCB1*-genet som koder for P-gp. Det er bl.a. rapportert at enkelt nukleotidpolymorfismene c.1236C>T (rs1128503), c.2677G>T (rs2032582) og c.3435C>T (rs1045642, jf. NM_000927.4) er assosiert med P-gp-aktivitet og dermed kan ha betydning for CNI-dosebehov (51).

1.4.3 Farmakodynamiske analyser

Fordi CsA har vært den foretrukne CNI fra den kom på markedet og fram til bare noen år siden, er mye av forskningen gjort på CsA. Siden foreslått hovedmekanisme bak den immunosupprimerende effekten til både CsA og takrolimus er hemming av kalsineurin, tenker man seg at resultater fra studier på CsA er overførbare til takrolimus, selv om det finnes kliniske forskjeller mellom de to substansene (58).

Flere metoder og farmakodynamiske parametre er blitt undersøkt for å kunne anslå biologisk effekt av CNI. Kalsineurinfosfataseaktivitet har blitt undersøkt som en potensiell selektiv farmakodynamisk markør for CNI-effekt (59). Kalsineurinaktivitet har vist en negativ

korrelasjon med CsA-dose, men for takrolimus blir enzymaktiviteten bare delvis nedsatt (60). Hemming av IL-2-produksjon forårsaket av CNI har også blitt vurdert som en mulig markør. IL-2-produksjon i fullblod har vist sammenheng med CsA-konsentrasjon, men også individuell variabilitet av IL-2-hemming ved samme CsA-dosering (61). Genekspresjon av *IL2* har også vist å kunne være en relevant markør for individuell respons til CNI (62). Det er imidlertid begrensninger med disse markørene, blant annet i forhold til individuell variabilitet og manglende sensitivitet (59,63,64). Den mest lovende metoden for farmakodynamisk monitorering av CNI har vist seg å være en kvantitativ analyse som måler ekspresjon av flere NFAT-regulerte gener. Genene som monitoreres, koder for cytokiner som er involvert i tidlige stadier av T-lymfocytaktiveringen (50). NFAT-regulert genekspresjon reflekterer kalsineurinhemming som i teorien er selektivt for CNI, selv om påvirkning av andre immunsupprimerende legemidler, spesielt glukokortikoider, ikke er tilstrekkelig undersøkt (50).

NFAT-regulert genekspresjon

Måling av NFAT-regulert genekspresjon under CsA-eksponering hos nyretransplanterte pasienter har vist sterkest hemming av genene *IL2*, *interferon (IFN) - γ* og *kolonistimulerende faktor (CSF) -2*. Basert på dette ble det utviklet en metode som videre har blitt brukt til CNI-monitorering (64). Genekspresjonen av de tre cytokinene etter CNI-dosering har vist sterk negativ korrelasjon med individuell blodkonsentrasjon (64), og hemming av genekspresjon er størst ved C_{maks} både for CsA og takrolimus (50). Monitorering av tre ulike gener gir en metode som er mer robust mot andre faktorer som påvirker uttrykket av enkeltcytokiner (64). Fordi genekspresjon av NFAT-regulerte gener har vist stort variasjon mellom pasientene, normaliseres genekspresjon ved C_{maks} til ekspresjonen pre-dose, slik at relativ grad av hemming sammenlignes. Relativ hemming er sannsynligvis et bedre mål på den spesifikke effekten av CNI, fordi det vil redusere betydningen av faktorer som trolig påvirker både pre- og post-dosenivåer (64). Relativ grad av hemming, eller restgenekspresjon (RGE) beregnes som genekspresjonen ved C_{maks} /genekspresjonen ved C_0 *100 (64). Metoden som har blitt brukt for monitorering av genekspresjonen i studier, baserer seg på sanntids-PCR, er standardisert, enkel å gjennomføre og praktisk i klinisk rutine (50).

De fleste kliniske studiene så langt har undersøkt NFAT-regulert genekspresjon hos pasienter som har fått CsA. Flere studier har sett på sammenhengene mellom NFAT-regulert RGE og kliniske utfall hos stabile nyretransplanterte pasienter. Sterk hemming av NFAT-regulert

genekspresjon hos pasienter som behandles med CsA, har vist sammenheng med økt risiko for infeksjoner, malignitet og gingival hyperplasi (65-68). Redusert CsA-dosering hos pasienter som førte til økt RGE, har vist forbedret blodtrykk i tillegg til stabilisering av nyrefunksjon og kreatinin (69).

På den andre siden har akutt reaksjon blitt assosiert med liten grad av hemming (65,69). I flere studier er det vist signifikant forskjell i RGE mellom pasienter som opplever bivirkninger, og de som ikke gjør det, til tross for at det ikke er vist statistisk forskjell i CsA-konsentrasjon mellom gruppene (65-67). Basert på studier med CsA har optimalt område for restekspresjon av NFAT-regulerte gener blitt foreslått å ligge mellom 15-30 % hos nyretransplanterte pasienter i stabil fase etter transplantasjon (65,68-70).

NFAT-regulert genekspresjon har også blitt undersøkt i noen studier med pasienter som får takrolimusbehandling. Pasienter med RGE > 30 % har vist økt risiko for reaksjon, men har også vist lavere risiko for å utvikle infeksjon og bedre nyrefunksjon sammenlignet med pasienter som har RGE < 30 % (71). I en annen studie har RGE < 20 % vist økt risiko for CMV-infeksjon, og RGE > 20 % er sett i sammenheng med akutt reaksjon (72). Flere studier har vist at en betydelig andel av pasientene som behandles med takrolimus, ikke oppnår like sterk hemming av NFAT-regulert genekspresjon som pasienter som får CsA (71-73). Det er også sett at noen pasienter som får takrolimus, har liten hemming av cytokinekspressjon med RGE så høy som over 80 %, uten tegn til reaksjon. Det er spekulert i at takrolimus, i tillegg til å hemme kalsineurin, kan virke immundempende via andre mekanismer (71).

Den sterke hemmingen av cytokinogenekspresjon som er rapportert i flere studier, tyder på at mange nyretransplanterte pasienter kan være overimmunsupprimert. Sommerer *et al.* fant i en studie at rundt 60 % av alle pasienter fem år etter nyretransplantasjon hadde RGE under 15 % (65). Siden den immunologiske risikoen etter fem år er relativt lav, tyder det på at mange pasienter får kraftigere immunsuppresjon enn nødvendig, og at en dosereduksjon ville vært gunstig for å forebygge nyretoksisitet og andre CNI-bivirkninger.

Inntil nå finnes det lite data fra tidlig fase etter nyretransplantasjon. I en studie ble RGE målt de første ukene etter transplantasjon hos pasienter som fikk CsA-behandling (50). Resultatene viste sterk hemming av genekspresjonen rett etter transplantasjon, sannsynligvis som følge av høy CsA-dosering hos pasientene initielt. Pasientene som fikk infeksjon tidlig etter transplantasjonen, hadde signifikant kraftigere cytokinhemming med lavere RGE, samtidig

som pasienter med rejeksjon viste høyere RGE. I 2007 ble den immundempende protokollen ved Rikshospitalet endret fra trippel immunsuppresjon med høyere CNI-dosering til et kvadruppelt regime med lavere CNI-doser (10). Kunnskapen om CNI-respons, målt som NFAT-regulert genekspressjon i tidlig fase etter transplantasjon, er begrenset, og det er foreløpig ikke publisert noen studier som undersøker cytokinekspressjonen i forhold til dagens lavdose takrolimusregime. For å undersøke nytteverdien av farmakodynamisk monitorering, er det viktig å studere genekspressjonsrespons i forhold til relevante takrolimuskonsentrasjoner også i den tidlige fasen etter transplantasjon.

2 Problemstilling

CNI inngår i dag som standard immunsuppressiv behandling etter organtransplantasjon. Innføringen av CNI har ført til en betydelig forbedring av graftoverlevelse på kort sikt (< 1 år) etter organtransplantasjon, men til tross for dette har det vært bare små forbedringer av langtidsoverlevelsen. Hovedutfordringene med CNI-behandling er at legemidlene har smale terapeutiske områder, variabel farmakokinetikk og en rekke alvorlige langtidsbivirkninger. I dag justeres dosen ut i fra blodkonsentrasjonsmålinger, noe som ikke alltid reflekterer biologisk effekt. Flere studier har vist at NFAT-regulert genekspressjon kan være en potensiell farmakodynamisk markør for måling av CNI-effekt (50). I tillegg er det rapportert at metabolismen av CNI varierer med *CYP3A4*- og *CYP3A5*-genvarianter, og at genotype dermed kan påvirke dosebehovet (41,42).

Hensikten med dette mastergradsprosjektet var å undersøke NFAT-regulert genekspressjon som farmakodynamisk markør for effekt av takrolimus, som er den foretrukne CNI i dag. I tillegg var det ønskelig å se på sammenheng mellom *CYP3A5*- og *CYP3A4*-genotype og dosebehov.

3 Materialer og metode

3.1 Reagenser og utstyr

Tabell 1 Oversikt over reagenser

Reagens / Kit	Produsent	Kat.nr.
1.4-Dithiothreitol, 10 g	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	10 708 984 001
DNAzap 1 og 2	Ambion/Applied biosystems. Austin, TX, USA	AM9890
Ionomycin	Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo, Norge	I 3909
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	04 707 494 001
Lysis/binding buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	03 542 394 001
MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	03 003 990 001
MagNA Pure LC RNA Isolation Kit – High Performance	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	03 542 394 001
Ms2 RNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	10 165 948 001
Phorbol 12-myristat 13-acetat	Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo, Norge	P 1585
Primere og prober, egendesignet	TIB MOLBIOL, Berlin Tyskland	
RPMI 1640 medium med L- glutamin og NaCO ₃	Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo, Norge	R 8758
TE-buffer 1X, Molecular Biology Grade	Promega Corporation, Madison, WI, USA	V 6231
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	04 897 030 001

Tabell 2 Oversikt over utstyr

Utstyr	Produsent	Kat.nr
EDTA-rør, 6 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Østerrike	456043
Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD, Franklin Lakes, NJ 07417 USA	352058
LightCycler® 480 Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	05 015 278 001
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	04 729 692 001
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	04 729 757 001
LightCycler® 480 Software, Version 1,5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland	04 994 884 001
MagNA Pure LC 2.0 Instrument	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	05 197 686 001
MagNA Pure LC Cartridge Seal	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 118 827 001
MagNA Pure LC Cooling Block, 96-well PCR Plate	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	12 189 674 001
MagNA Pure LC Cooling Block, Reaction tubes	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	12 189 666 001
MagNA Pure LC Medium Reagent Tubs 20	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 058 001
MagNA Pure LC Medium Reagent Tubs 30	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 045 501 001
MagNA Pure LC Processing Cartridge	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 147 001
MagNA Pure LC Reaction Tip (large)	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 171 001
MagNA Pure LC Reaction Tip (small)	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 180 001
MagNA Pure LC Reagent Tubs (large)	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 040 001
MagNA Pure LC Sample Cartridges	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 112 001
MagNA Pure LC Tub Lid (large)	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 074 001

MagNA Pure LC Tub Lid (small, medium)	Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland	03 004 082 001
Microtubes, 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland	72 692 105
MiniCycler	MJ Research	PTC-150
Natrium-heparinrør, 6 mL	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Østerrike	456051

3.2 Pilotstudie

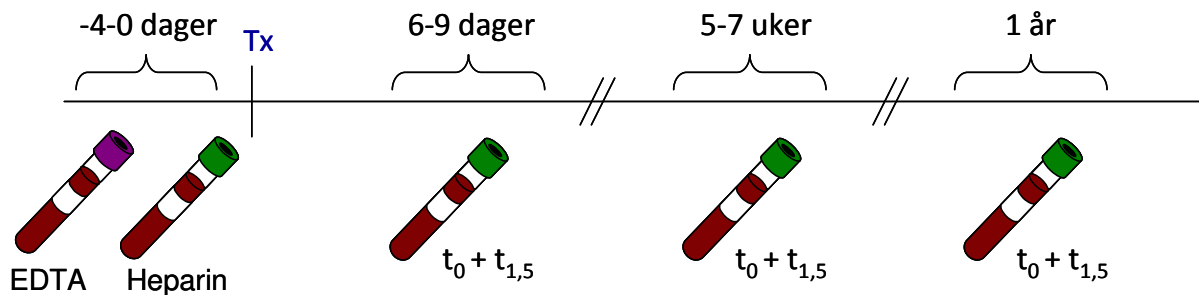
Pilotstudien *Molekylære biomarkører for immundempende behandling hos nyretransplanterte* er en kohortstudie som er planlagt å inkludere 30 nyretransplanterte pasienter. Inklusjonen av pasienter startet i februar 2012, og så langt (per april 2013) har 17 pasienter blitt inkludert i pilotstudien. Inklusjonskriteriene er pasienter over 18 år som er godkjent for nyretransplantasjon ved OUS, Rikshospitalet med nyre fra en levende donor, og at det er planlagt takrolimusbasert immunsuppresjon. Pasienter blir ekskludert dersom de ikke får takrolimus, eller dersom det er medisinske begrensninger for blodprøvetaking. Alle deltakere i studien må undertegne skriftlig informert samtykke. Pasientene vil motta immunsuppressiv behandling i henhold til standard protokoll for nyretransplantasjon ved OUS, Rikshospitalet. Pilotstudien er godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

Det overordnede målet for pilotstudien er å undersøke ulike potensielle biomarkører for effekten av immundempende legemidler hos transplanterte pasienter. Det er planlagt å se på molekylære biomarkører på DNA-, RNA-, protein- og metabolitnivå. Delprosjektet som inngår i denne mastergraden, involverer analyse av NFAT-regulert genekspressjon som en mulig farmakodynamisk biomarkør for takrolimuseffekt, og farmakogenetiske DNA-analyser som kan bidra til å forklare individuelle variasjoner i takrolimus-farmakokinetikk.

3.2.1 Pasientprøver

Blodprøver til genotyping ble tatt i etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)-rør før transplantasjon. Til genekspressionsanalysene ble det tatt blodprøver i heparin-rør ved ett

tidspunkt før transplantasjon. Etter transplantasjon ble det tatt prøver før (t_0) og 1,5 timer etter ($t_{1,5}$) takrolimusdose ved tre tidspunkter hhv. etter 6-9 dager, 5-7 uker og ca. 1 år (Figur 2). Prøvetidspunktene 6-9 dager og 5-7 uker etter transplantasjon vil heretter bli omtalt som hhv. 1 uke og 6 uker.



Figur 2 Blodprøvetaking til genekspressjonsanalyser og genotyping. Det ble tatt blodprøver før transplantasjon og pre-dose (t_0), og 1,5 time post-dose ($t_{1,5}$) ved tre tidspunkter etter transplantasjon (Tx). EDTA-blod ble brukt til genotyping, og heparin-blod ble brukt til genekspressjonsanalyser.

3.3 *Ex vivo* lymfocytaktivering i fullblod

Genekspressjonen av NFAT-regulerte cytokiner i ustimulerte lymfocytter er svært lav. Binding av fremmed antigen til T-lymfocytreseptoren *in vivo* og samtidig tilstedeværelse av nødvendige kostimulatoriske signaler, fører til T-lymfocytaktivering. Dette resulterer i økt kalsiumkonsentrasjon i cytoplasma som igjen aktiverer bl.a. kalsineurin og protein kinase C (PKC), som er viktige mediatorer av den videre immunresponsen. Denne reaksjonen kan simuleres *ex vivo* ved å bruke en kombinasjon av en kalsiumionofor (f.eks. ionomycin) og en forbolester (f.eks. phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)). Ionomycin øker kalsiumkonsentrasjonen og PMA aktiverer PKC (74,75). Immunresponsen etter *ex vivo* inkubering med mitogener, kan slik indikere potensialet for immunaktivering *in vivo*, f.eks. ved en reaksjonsepisode. Det ble laget et stimuleringsmedium av RPMI 1640 med L-glutamin og NaHCO_3 , tilsatt mitogenene PMA (100 ng/mL) og ionomycin (5 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

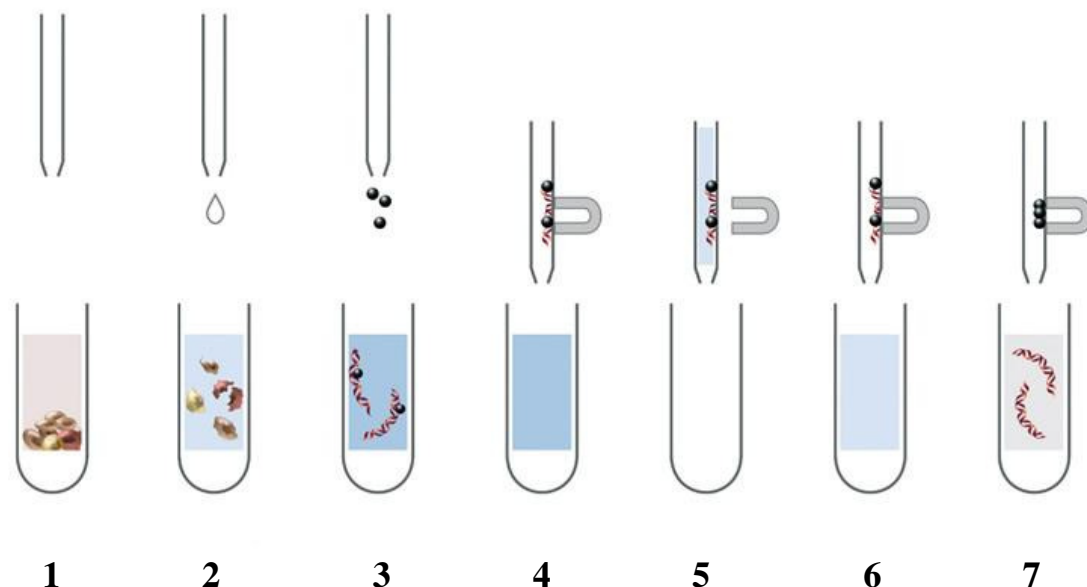
Ex vivo immunaktivering ble utført ved å blande 150 μL heparinisert fullblod og 150 μL stimuleringsmedium i 5 mL Falcon-polystyrenrør, og deretter inkubere rørene i varmeskap

ved 37 °C i 3 timer (første trinn i Figur 5). Som kontroll for stimuleringstrinnet ble tilsvarende volum fullblod inkubert med RPMI-medium uten mitogener. Etter inkuberingen ble det fra hvert rør overført 200 µL celleduspensjon til separate Sarstedt-rør (1,5 mL), før det ble tilsatt 700 µL Lysis/Binding-buffer (LBB) med 1 % ditioneitol (DTT) til hvert rør. Lysis/Binding-bufferen gir lysing av blodcellene og stabiliserer mRNA-profilen ved bl.a. inaktivering av RNaser. Prøvene ble blandet godt ved vortexing i 30 sekunder, og frosset ned ved -70 °C inntil RNA-isolering.

3.4 Isolering av RNA til genekspressjonsanalyser

Isolering av total-RNA ble gjort på MagNA Pure LC, et automatisert system som består av instrument, data, programvare og kit med reagenser. MagNA Pure gir en rask og automatisert isolering av nukleinsyrer med minimal risiko for kontaminasjon og forbyttning av prøver.

Før isolering ble cellelysateene tint og blandet godt, deretter ble 800 µL prøvevolum overført til MagNa Pure Sample Cartridge. I hver isolering ble det også tatt med en negativ kontrollprøve uten RNA. Isoleringen ble gjort ved bruk av MagNa Pure LC RNA Isolation Kit og RNA HP blood external lysis-protokoll som beskrevet av produsenten (www.roche-applied-science.com). Ekstraksjonsprinsippet er vist i Figur 3.



Figur 3 Hovedtrinn for isolering av total-RNA på MagNA Pure LC. Figur fra www.roche-applied-science.com Lysis/Binding buffer (LBB) lyserer cellene fullstendig slik at RNA frigis, i tillegg til at RNaser denatureres (trinn 1). Proteinase K bryter ned proteiner (trinn 2). Nukleinsyrer bindes til silikaoverflaten på magnetiske glasspartikler som følge av kaotrope salter, isopropanol og den høye ionestyrken til LBB. DNA blir fjernet vha. DNase-behandling (trinn 3). Ny tilsetning av isopropanol fører til at RNA igjen bindes til de magnetiske glasspartiklene som deretter kan separeres magnetisk fra resten av prøvematerialet (trinn 4). Glasspartiklene med bundet RNA vaskes flere ganger med vaskebuffer for å få fjernet ubundne substanser som proteiner, cellemembraner, PCR-hemmere, og for å redusere konsentrasjonen av kaotrope salter (trinn 5). Ved hjelp av magnet separeres total-RNA bundet til magnetiske glasspartiklene fra vaskebufferen og resterende prøvemateriale, før det rensede RNAet til slutt blir eluert fra glasspartiklene ved 70 °C og overført til brønner på kjøleblokk (trinn 7).

RNA er svært ustabil og ble eluert rett i 32-brønners Brett som står på kjølebokk i instrumentet. Elueringsvolumet var 50 µL. Prøvene ble deretter satt over på is, og overført til Sarstedt-rør (1,5 mL) som ble frosset ned ved -70 °C inntil videre cDNA-syntese (se avsnitt 3.6).

3.5 Isolering av DNA til genotyping

Isolering av DNA ble i likhet med RNA-isolering, gjort på MagNA Pure LC. Det ble brukt reagenser fra MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I, og isolering ble gjort etter DNA blood cells high performance-protokoll som beskrevet av produsenten (Roche). Fremgangsmåten for isolering av DNA er den samme som isolering av RNA, bortsett fra at kitet som brukes ved DNA-isolering ikke inneholder DNase. Det ble tatt med en negativ kontrollprøve uten DNA i hver isolering.

Etter isoleringen ble DNA frosset ned ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil genotyping (se avsnitt 3.7.2).

3.6 cDNA-syntese

RNA fungerte som templat for cDNA-syntese ved revers transkripsjon på thermal cycler med reagenser fra Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit etter produsentens anvisning (www.roche-applied-science.com).

Reaksjonen utføres i sterile nukleasefrie PCR-rør, og det tilsettes MS2-RNA til en endelig konsentrasjon på $10\text{ }\mu\text{g/mL}$. MS2-RNA fungerer som bærer-RNA som bidrar til å stabilisere RNA og redusere adsorpsjon til rør o.l. Trinnene i cDNA-syntese er vist i Tabell 3. Til hvert rør tilsettes RNA, vann og en blanding med oligo-deoksytymidin (dT) og random heksamere primere (trinn 1). Blandingen av templat og primer-miks pre-inkuberes ved $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre denaturering av sekundære RNA-strukturer. Etter avkjøling på is tilsettes en mastermikse med de resterende reagensene (Tabell 3) til et totalt volum på $20\text{ }\mu\text{L}$. Reaksjonen startes så med en inkubering ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (trinn 2), hvor primerene bindes til RNA-templatet, og cDNA-syntesen initieres. Ved trinn 4 og 5 økes temperaturen til den optimale temperaturen for cDNA-syntese, og reaksjonen avsluttes med en temperaturøkning til $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ (trinn 6) for å inaktivere enzymet Transcriptor reverse transcriptase, og deretter avkjøles til $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Det ble laget doble porsjoner med cDNA ($40\text{ }\mu\text{L}$) fra hver prøve for å få tilstrekkelig volum for analyse av flere gener og replikater. Porsjonene ble slått sammen i Sarstedt-rør ($1,5\text{ mL}$) og fortynnet med vann med MS2-RNA, før cDNAet ble frosset ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil videre genekspresjonsanalyser.

Tabell 3 Trinn i cDNA-syntese

Trinn	Temp (°C)	Tid (min)	Reagenser som tilsettes	Volum til hvert rør (0,2 mL-rør)
1	65	5	<u>Templat-primer-miks:</u> Anchored- oligo(dT) ₁₈ -primer Random hexamer primer Vann med Ms2-RNA RNA-eluat	2,0 µL 1,0 µL 5,0 µL 5,0 µL
2	25	10	<u>Mastermiks:</u> RT reaction buffer Protector RNase inhibitor Deoxynucleotide mix Reverse transcriptase	4,0 µL 0,5 µL 2,0 µL 0,5 µL
3	Gradvis økning i temperatur fra 20 til 55 °C. Slope: +30, 0,3°C/sek			
4	55	30		
5	60	5		
6	85	5		
7	4	"forever"		

3.7 PCR

PCR er en metodikk som amplifiserer spesifikke DNA-sekvenser. Teknikken involverer denaturering av dobbeltrådet DNA og enzymatisk replikasjon med varmestabil DNA-polymerase, i gjentatte syklener med temperaturregulering. Et primerpar, hhv. "forward" og "reverse" primer, definerer hvor DNA-polymerasen starter replikasjonen og dermed også hvilken sekvens som amplifiseres.

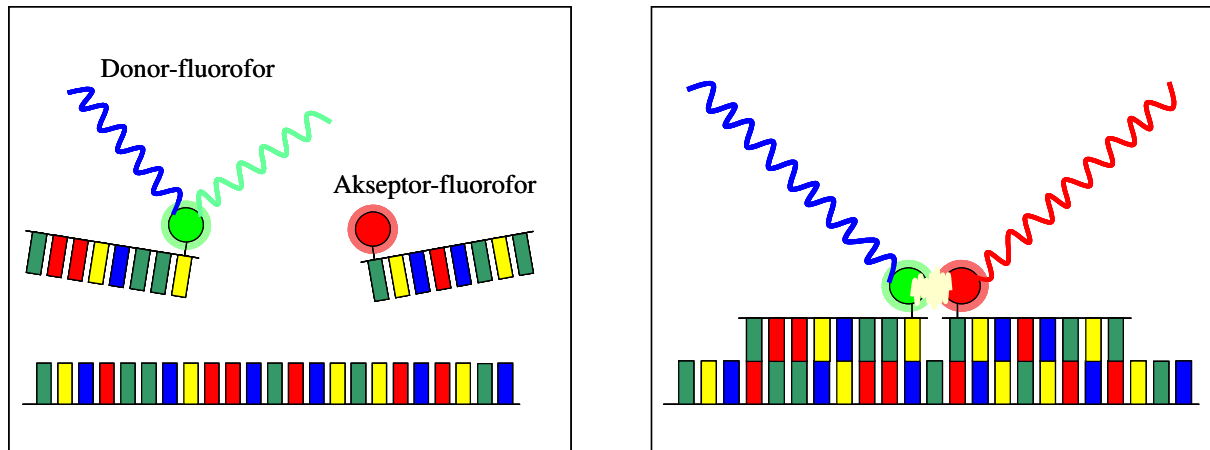
3.7.1 Sanntids-PCR

Ved sanntids-PCR monitoreres mengde PCR-produkt underveis i reaksjonen ved hjelp av fluoroforer og fluorescensmålinger i hver syklus. Sanntids-PCR har bedre sensitivitet og reproduserbarhet sammenlignet med konvensjonell PCR. Analyse av PCR-produktene i et lukket system er mindre arbeidskrevende og gir lavere risiko for kontaminasjon sammenlignet med f.eks. gelelektroforese. Ved kvantitativ sanntids-PCR brukes data generert i den eksponentielle fasen hvor PCR-effektiviteten er høyest. Dette gir mulighet for nøyaktig og presis kvantifisering over et stort dynamisk område.

Det ble brukt sanntids-PCR både til analyse av genekspressjon og til genotyping (analyse av genvarianter). Reaksjonene ble utført i 96-brønners plater på LightCycler® 480 instrument. Til hver brønn ble det tilsatt templat (DNA eller cDNA) og en mastermiks med primere og prober, vann (PCR-kvalitet) og LightCycler® 480 Probes Master til et endelig volum på 20 µL. Probes Master reagenset er en ferdig blanding DNA-polymerase, deoksynukleotider, buffer og MgCl₂ (se Vedlegg 1, 2 og 3 for ytterligere detaljer).

De spesifikke PCR-programmene for genekspressionsanalyse og genotyping er beskrevet hhv. i Tabell 4 og 6. I det første trinnet varmes reaksjonsblandingen opp til 95 °C slik at hydrogenbindingene mellom nukleotidene brytes, og dobbeltrådet DNA denatureres til enkeltrådet DNA. Deretter senkes temperaturen til rundt 60 °C slik at oligonukleotidprimerne bindes til hhv. sense og antisense DNA-tråd i 5'-enden av sekvensen som skal amplifiseres. I det samme trinnet bindes to hybridiseringsprober til gensekvensen mellom de to primerene. Hybridiseringsprober er et par med oligonukleotider som er merket med to ulike fluoroforer i hhv. 3'- og 5'-ende. LightCycler-instrumentet sender ut lys med en bølgelengde som vil eksitere fluoroforen i 3'-enden av donorproben (ofte fluorescein). Energien som frigjøres når fluoroforen går tilbake til sin grunntilstand, overføres til fluoroforen (f.eks. LC Red 640) i 5'-ende av akseptorproben, som igjen vil eksiteres og sende ut et fluorescenssignal med en høyere bølgelengde (Figur 4). Denne prosessen kalles fluorescens resonans energioverføring (FRET), og avhenger av at begge probene er bundet spesifikt til PCR-produktet med en avstand på ett til fem nukleotider. Fluorescenssignalet fra akseptorfluoroforen detekteres av instrumentets optiske enhet. I det siste trinnet økes temperaturen til 72 °C som er optimal temperatur for at enzymet DNA-polymerase vil syntetisere en ny DNA-tråd, som er

komplementær til templatet. Hele syklusen gjentas så 40-45 ganger, og mengde nysyntetisert DNA vil øke eksponentielt med antall sykler.

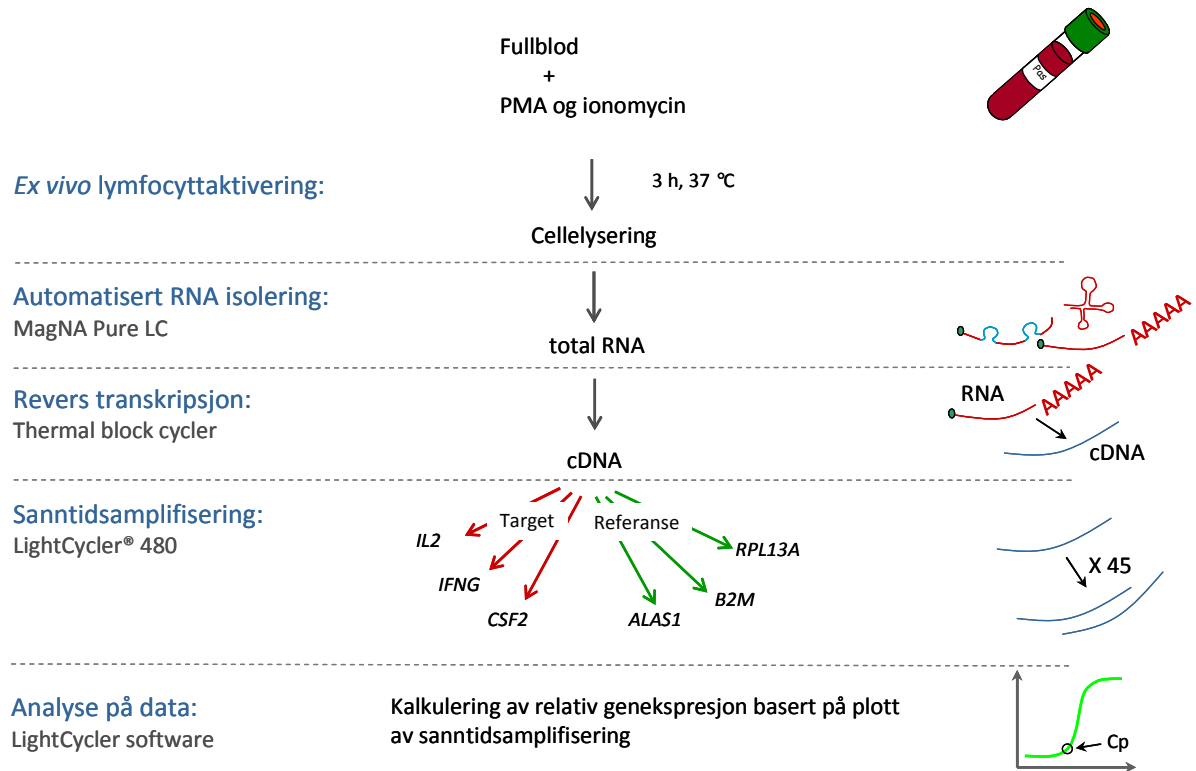


Figur 4 Fluorescens resonans energioverføring (FRET) mellom to hybridiseringsprober.

To hybridiseringsprober merket med ulike fluoroforer bindes spesifikt til PCR-produktet. Lys som sendes inn vil eksitere donor-fluoroforen, som frigjør energi når den går tilbake til grunntilstand. Energien overføres til akseptorfluoroforen som sender ut fluorescenssignal som detekteres.

Kvantitativ sanntids-PCR

Oversikt over hovedtrinnene i genekspresjonsanalysen er vist i Figur 5.



Figur 5 Oversikt over hovedtrinnene for kvantifisering av NFAT-regulert genekspresjon i fullblod.

ALAS, 5-aminolevulinatsyntase 1; *B2M*, beta-2-mikroglobulin; *CSF2*, kolonistimulerende faktor 2; *IFNG*, interferon gamma; *IL2*, interleukin 2; *RPL13A*, ribosomal protein L13a; PMA, phorbol 12-myristat 13-acetat

PCR-programmet som ble brukt til relativ kvantifisering av genekspressjon, er vist i Tabell 4. Det ble kjørt to replikater for hver prøve.

Tabell 4 PCR-program for kvantitativ analyse av genekspressjon

Program		Temperatur (°C)	Tid	Antall sykler
Denaturering		95	10 min	1
Amplifisering	Denaturering	95	10 sek	45
	Primerbinding	57	10 sek	
	Primerforlengelse	72	10 sek	
Smeltekurveanalyse		99	5 min	1
		45	1 min	
		90	Gradvis økning	
Avkjøling		40	30 sek	1

Primer- og probesekvenser som ble brukt, er oppgitt i Tabell 5. Primerene og probene er tidligere spesialdesignet for spesifikk og effektiv amplifikasjon av de ønskede sekvensene (se Vedlegg 1 og 2 for ytterligere detaljer).

Tabell 5 Primer- og probesekvenser for målgenene *IL2*, *IFNG*, *CSF2*.

Gen	Navn	Oligonukleotid	Sekvens
<i>IL2</i>	IL2_F1	Forward primer	AAACTTTCACCTAAGACCCAG
	IL2_R1	Reverse primer	AGTGTTGAGATGATGCTTTG
	IL2_FL1	Donorprobe	GGGATCTGAAACAACATTCATGTGTG-Fluorescein
	IL2_LC1	Akseptorprobe	LC Red 640-TATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTT-Fosfat
<i>IFNG</i>	IFNG_F1	Forward primer	GCAGAGCCAAATTGTCTCCT
	IFNG_R1	Reverse primer	ATGCTCTTCGACCTCGAAAC
	IFNG_FL1	Donorprobe	AACTGTCGCCAGCAGCTA-Fluorescein
	IFNG_LC1	Akseptorprobe	LC Red 640-ACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAG-Fosfat
<i>CSF2</i>	CSF2_F1	Forward primer	TTGAAAGTTTCAAAGAGAACCT
	CSF2_R1	Reverse primer	GATGACCATCCTGAGTTTCTA
	CSF2_FL1	Donorprobe	GACTGCTGGGAGCCAGTC-Fluorescein
	CSF2_LC1	Akseptorprobe	LC Red 640-GGAGTGAGACCGCCAGATGAG-Fosfat

Relativ kvantifisering av genekspressjon

PCR-prosessen kan beskrives med ligning 1. I teorien doubles antall PCR-produkt i hver amplifikasjonssyklus, dvs. at PCR-effektiviteten (E) er 100 % (E = 2, ligning 1). I praksis er som regel effektiviteten noe lavere, og det er viktig å korrigere for dette ved å bruke den reelle effektiviteten (ligning 2). Denne ligningen danner grunnlaget for kvantifisering ved sanntids-PCR, og parametrene som måles er PCR-effektivitet og terskelsyklus også kalt "Crossing point" (Cp)-verdi. Reell PCR-effektivitet for de tre mål- og referansegenene har tidligere blitt estimert vha. stigningstallet til standardkurver generert ved amplifisering av seriefortynnet cDNA (ligning 3). Cp-verdier reflekterer antall PCR-sykluser som må til før fluorescensen i en prøve har nådd en bestemt terskelverdi og begynner å stige eksponentielt. En Cp-verdi representerer derfor et bestemt antall kopier, og er det punktet som korrelerer best med antall kopier ved start.

$$N_{Cp} = N_0 \times 2^{Cp} \quad (1)$$

$$N_{Cp} = N_0 \times E^{Cp} \quad (2)$$

$$E = 10^{-1/\text{stigningstall}} \quad (3)$$

E, PCR-effektivitet; Cp, crossing point; N_{Cp} , antall kopier ved Cp; N_0 , antall kopier ved start

Genekspressjon av de tre målgenene *IL2*, *IFNG* og *CSF2* ble kvantifisert relativt til ekspressjonen av tre referansegener. Tidligere undersøkelser har vist at genene 5-aminolevulinatsyntase 1 (*ALAS1*), beta-2-mikroglobulin (*B2M*) og ribosomal protein L13a (*RPL 13A*), er relativt stabilt uttrykt i blodceller hos transplanterte pasienter (76,77). Disse genene ble derfor valgt som referansegener også i denne studien. Referansegener fungerer som en intern standard og korrigerer for variasjoner mellom prøvene som f.eks. skyldes pipetteringsfeil, forskjeller i startvolum, isolasjonsutbytte, cDNA-synteseeffektivitet og RNA/DNA-degradering.

Til slutt ble LightCycler software brukt til å gjøre analyse av genekspressjonen. Relativ genekspressjonen til hvert målgen ble normalisert til et geometrisk gjennomsnitt av de tre referansegenene (ligning 4). Videre ble ratio mellom målgen/referansegen for hver prøve

normalisert til målgen/referansegene for en kalibrator (ligning 5). Kalibratoren korrigerer for forskjeller i deteksjon av mål- og referansegener, og fungerer som en positiv kontroll og et konstant kalibreringspunkt mellom ulike PCR-kjøringer.

Det samlede uttrykket av de tre NFAT-regulerte cytokinene ble beregnet ved å ta det geometriske gjennomsnittet av genekspressjonene av de tre målgenene, *IL2*, *IFNG* og *CSF2*.

Til slutt ble restgenekspressjon (RGE) beregnet ved å normalisere NFAT-regulert genekspressjon 1,5 timer etter dose ($C_{1,5}$) til genekspressjonen pre-dose (C_0) (ligning 6).

Normalisering til pre-doseverdier reduserer betydningen av bl.a. genetiske faktorer eller andre faktorer med langvarig effekt på cytokinekspressjon. RGE vil derfor være et mer selektivt mål for takrolimuseffekt sammenlignet med relativ genekspressjon før eller etter dose.

$$\text{Relativ genekspressjon} = \frac{[IL2] \text{ eller } [IFNG] \text{ eller } [CSF2]}{([ALAS1] \times [B2M] \times [RP L13A])^{1/3}} \quad (4)$$

$$\text{Relativ genekspressjon normalisert til kalibrator} = \frac{\text{Relativ genekspressjon}_{\text{Prøve}}}{\text{Relativ genekspressjon}_{\text{Kalibrator}}} \quad (5)$$

$$\text{Restgenekspressjons (RGE)} = \frac{\text{Relativ genekspressjon normalisert til kalibrator ved } C_0}{\text{Relativ genekspressjon normalisert til kalibrator ved } C_{1,5}} \quad (6)$$

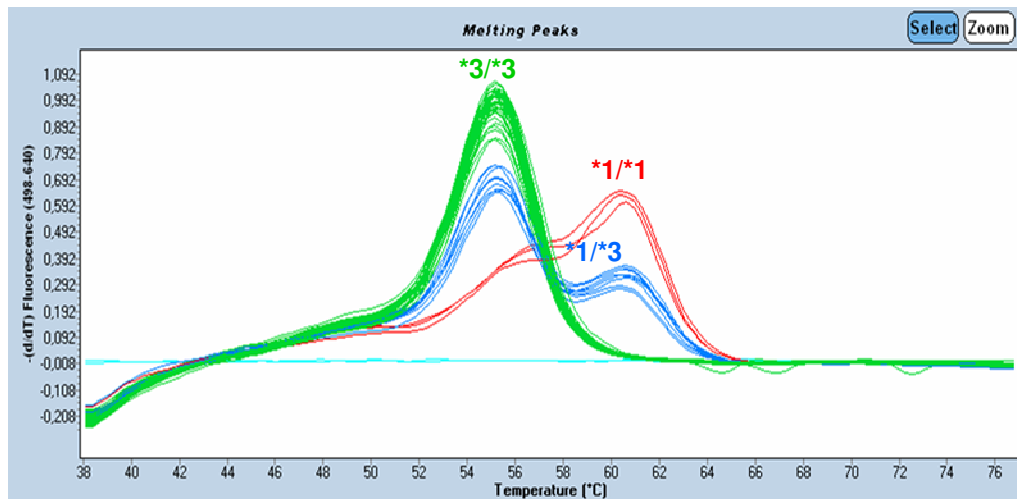
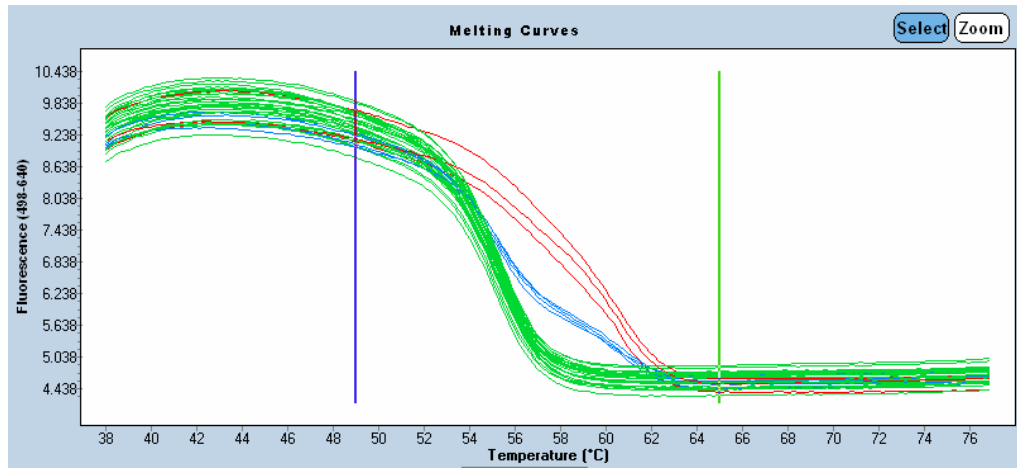
3.7.2 Genotyping ved sanntids-PCR og smeltekurveanalyse

CYP3A4- og *CYP3A5*-genotyping omfattet analyse av genvariantene *CYP3A4**22 (c.522-191C>T, rs35599367) og *CYP3A5**3 (c.219-237A>G, rs776746). Genotypingen startet med sanntids-PCR etterfulgt av en smeltekurveanalyse (PCR-program i Tabell 6). Ved

smeltekurveanalysen monitoreres fluorescensen kontinuerlig mens temperaturen gradvis økes fra 38 °C til 77 °C. Ved lav temperatur vil begge hybridiseringsprobene være bundet til PCR-produktet, og fluorescenssignalet vil være høyt. Når temperaturen økes, vil probene gradvis løsne fra PCR-produktet og fluorescenssignalet reduseres. Smeltepunktet (T_m) defineres som temperaturen hvor 50 % av probene er bundet og 50 % har løsnet. Den ene proben (sensorproben) er designet til å bindes til området med sekvensvarianten som analyseres. Analyseprinsippet baserer seg på at sensorproben vil ha full match eller en mismatch med DNA-tråden, avhengig av sekvens. En mismatch fører til svakere interaksjon mellom probe og DNA-tråd og dermed lavere T_m . Dataprogrammet presenterer smeltekurvene som smeltetopper ved å plote negativt deriverte fluorescensverdier mot temperatur. De ulike genotypene skilles så fra hverandre på grunnlag av T_m til toppene (Figur 6). Primer- og probesekvenser som ble brukt er oppgitt i Tabell 7 (se Vedlegg 3 for ytterligere detaljer).

Tabell 6 PCR-program for genotyping

Program		Temperatur (°C)	Tid	Antall sykler
Denaturering		95	5 min	1
Amplifisering	Denaturering	95	10 sek	40
	Primerbinding	63-59 (2,2 °C/s)	10 sek	
	Primerforlengelse	72	30 sek	
Smeltekurveanalyse		99	10 min	1
		38	1 min	
		77	Gradvis økning	
Avkjøling		40	30 sek	1



Figur 6. Smeltekurvene med hybridiseringsprober før derivering (A) og etter derivering (B). Match og mismatch mellom DNA-tråd og probe vil gi ulikt smeltepunkt, og dermed ulik fluorescens. Full match, mismatch i ett allel og mismatch i to alleler er vist med hhv. grønne, blå og røde kurver.

Tabell 7 Primer- og probesekvenser for CYP3A5*3 og CYP3A4*22.

Gen	Navn	Oligonukleotid	Sekvens
CYP3A5*3	CYP3A5-3_F5	Forward primer	ATGGAGAGTGGCATAGGA
	CYP3A5-3_R4	Reverse primer	ACACACAGCAAGAGTCTCA
	CYP3A5-3_LC3	Sensorprobe	GAGCTCTTTTGTCTTTCA <u>A</u> TATCTCT-Fluorescein
	CYP3A5-3_LC4	Ankerprobe	LC640- CCCTGTTTGGACCACATTACCCTT -Fosfat
CYP3A4*22	CYP3A4-22_F1	Forward primer	AGCCCCTTAGGAAGAGTT
	CYP3A4-22_R1	Reverse primer	AGAAGGTGTTATCAGGTGC
	CYP3A4-22_FL1	Ankerprobe	CTTGATCTCAGAGGTAGGTCTAATTCAGTTCAGTG-Fluorescein
	CYP3A4-22_LC1	Sensorprobe	LC Red 640-TCCATCACACCCAG <u>C</u> GTAGG-Fosfat

Posisjon for sekvensvariant er understreket.

3.8 Kliniske endepunkter

Det ble gått igjennom pasientjournaler for å hente inn informasjon om eventuelle tilfeller av rejeksjon og viremi eller andre komplikasjoner. Som mål på nyrefunksjon ble GFR estimert (mL/min/1,73m²) vha. MDRD ("modification of diet in renal disease")-formelen og informasjon om serumkreatinin, alder og kjønn (78).

3.9 Statistikk

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av statistikkprogrammet SPSS versjon 18 for Windows. Fordi genekspresjonsdataene ikke var normalfordelte, prøveantallet var lavt og noen datapunkter manglet, ble det brukt ikke-parametriske tester. Data fra avhengige og uavhengige grupper ble testet vha. hhv. paret Wilcoxon-test og uparet Mann-Whitney U test. Samvariasjon mellom verdiene i to datasett ble analysert vha. Spearman rank og Pearsson korrelasjonsanalyse. Grensen for statistisk signifikans ble satt til P<0,05 (tosidig test).

4 Resultater

4.1 Pasienter

Inklusjonen av pasienter til pilotstudien startet i februar 2012 og i løpet av våren 2012 ble det inkludert fem nyretransplanterte pasienter. I løpet av dette masterprosjektet, som er utført fra august 2012 til mai 2013, har det blitt inkludert ytterligere 12 pasienter i pilotstudien. Så langt involverer studien data t.o.m. 1 år etter transplantasjon for de fem første pasientene, 6-ukersperioden for ytterligere 11 pasienter, og 1 uke for den sist inkluderte pasienten.

Personkarakteristika er vist i Tabell 8. To av pasientene er HLA-identiske med donor og følger trippel legemiddelprotokoll uten mykofenolat. Én av pasientene var sensibilisert og klassifisert som ”høyrisiko”. Pasienten fikk rituximab i 30 dager før transplantasjonen og humant normalt immunoglobulin fem påfølgende dager etter transplantasjonen, i tillegg til standard kvadrupel immunsuppresjon med forhøyet takrolimus- og glukokortikoid-dosering. Ca. 3/4 av de inkluderte pasientene er menn. Det er stor spredning i alder og i kroppsvekt mellom pasientene.

Tabell 8 Kliniske og demografiske data for nyretransplanterte pasienter

Personkarakteristikk	Antall (%)	Median (range)
Kjønn (mann/kvinne)	13/4 (76/24)	
Alder (år)		58 (21-72)
Vekt (kg)		81 (53-97)
Predialytisk (ja/nei)	8/9 (47/53)	
Antall sensibiliserte (ja/nei)	1/16 (6/94)	
Antall HLA-mismatch		
Totalt		2 (0-6)
DR		1 (0-2)
HLA-identisk (ja/nei)	2/15 (12/88)	
CMV serostatus		
D+/R+	10 (59)	
D+/R-	3 (18)	
D-/R-	2 (12)	
D-/R+	2 (12)	
GFR, 1 år (mL/min/1,73m ²)		71 (50-79)
Konvertert til Advagraf før 6 uker post-Tx (ja/nei)	1/16 (6/94)	
Konvertert til Advagraf før 1 år post-Tx (ja/nei)	3/2 (60/40)	

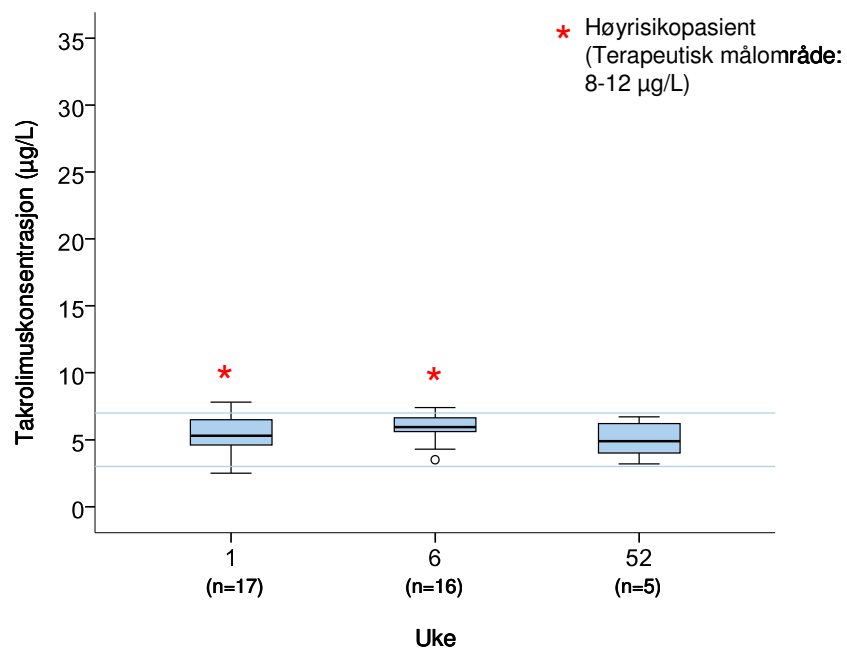
DD, Avdød donor; LD, levende donor; CMV, cytomegalovirus; D, donor; R, resipient; GFR, glomerulær filtrasjonshastighet

4.2 Takrolimuskonsentrasjon

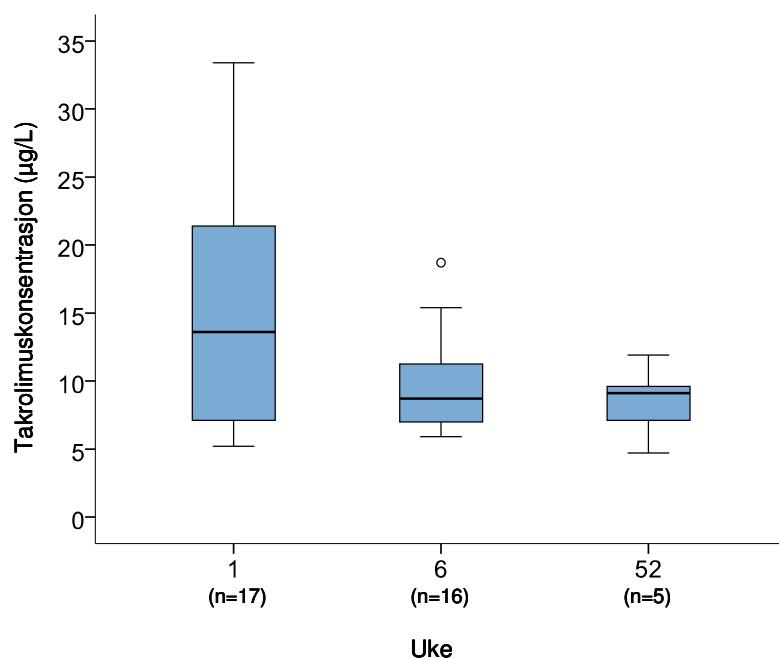
I første periode, ca. 1 uke etter transplantasjon, var median takrolimus C₀ 5,3 µg/L (2,5-7,8; n=16). Høyrisikopasienten hadde takrolimus C₀ på 10,6 µg/L. Med unntak av én pasient hadde alle pasientene pre-dose nivåer innenfor det terapeutiske målområdet, som er 3-7 µg/L, eller 8-12 µg/L for høyrisikopasienter (Figur 7a). Lignende konsentrasjoner ble observert 5-7 uker og 1 år etter transplantasjon med median takrolimus C₀ på hhv. 5,9 µg/L (3,5-7,4; n=15) og 5,1 µg/L (3,2-6,7; n=5) (Figur 7a). For høyrisikopasienten var tilsvarende takrolimus C₀ henholdsvis 10,4 µg/L og 4,9 µg/L. Takrolimus C_{1,5} varierer i mye større grad mellom

pasientene 1 uke etter transplantasjon, med konsentrasjoner fra 5,2 til 25,3 $\mu\text{g/L}$ (33,5 $\mu\text{g/L}$ for høyrisikopasient) (Figur 7b). I motsetning til relativt stabile pre-dosenivåer i tiden etter transplantasjon, var det tendens til reduksjon av takrolimus $C_{1,5}$ fra median 13,4 $\mu\text{g/L}$ (5,2-25,3; n=16) ved uke 1, til median 8,3 $\mu\text{g/L}$ (5,9-18,7; n=15) etter 6 uker ($P=0,056$), og median 8,4 $\mu\text{g/L}$ (4,7-11,9; n=4) etter ett år (Figur 7b). Median takrolimusdose normalisert til vekt var 0,038 mg/kg (0,01-0,08; n=17) etter 1 uke og 0,034 mg/kg (0,01-0,07; n=16) etter 6 uker. Forskjell i takrolimusdose mellom uke 1 og 6 var ikke signifikant ($P=0,334$). Fire pasienter byttet takrolimusformulering til Advagraf® med modifisert frisetting. Én pasient byttet før prøvetaking ved 6 uker, og de tre andre før prøvetaking ved 1 år.

A Pre-dose



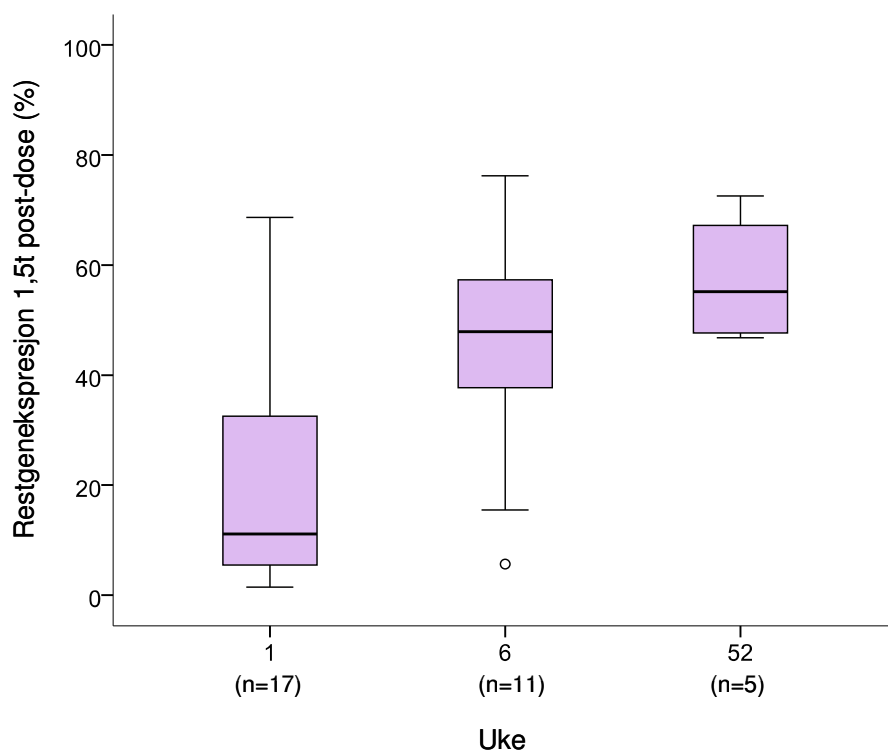
B 1,5 timer post-dose



Figur 7 Takrolimuskonsentrasjon 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon målt A: pre-dose (C_0) og B: 1,5 time post-dose ($C_{1,5}$). Terapeutisk område for takrolimus C_0 på 3-7 µg/L er markert med blå linjer (A).

4.3 NFAT-regulert genekspressjon

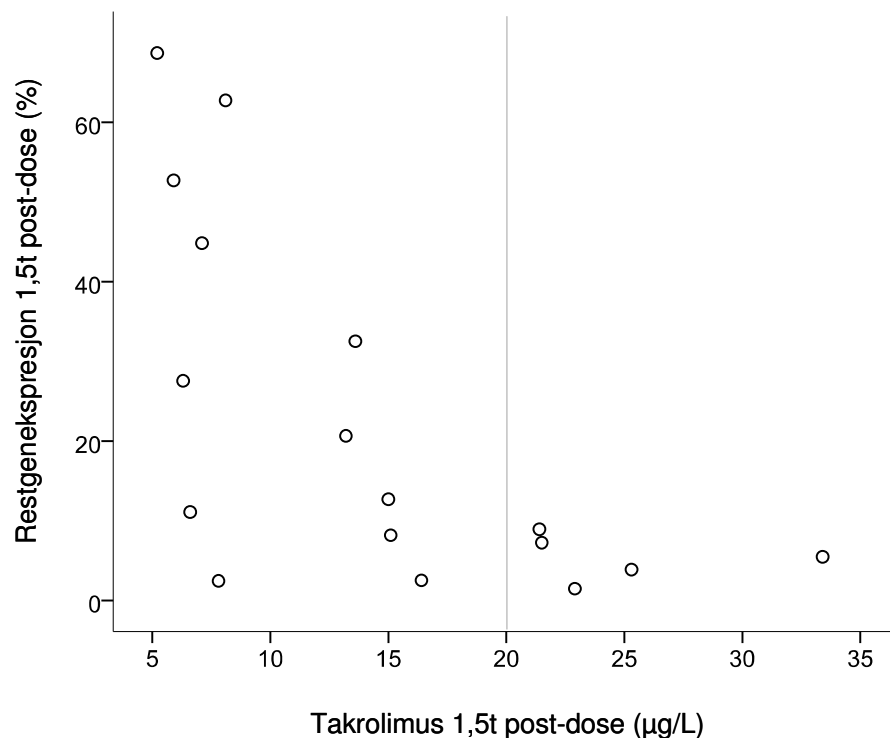
En uke etter transplantasjon hadde flertallet av pasientene kraftig hemming av NFAT-regulerte cytokiner 1,5 timer etter takrolimusdosering. Median RGE var 11 % (2-69 %, n=17) og 53 % av pasientene hadde RGE under 20 % (Figur 8). Ved 6 uker etter transplantasjon var det var imidlertid en tendens til redusert hemming av cytokinresponsen sammenlignet med responsen etter 1 uke (P=0,062). Samme tendens til redusert hemming i forhold til første uke ble sett etter 1 år (P=0,068). Etter 6 uker og 1 år var median RGE henholdsvis 48 % (6-76 %, n=11) og 55 % (47-73 %, n=4) (Figur 8). På grunn av teknisk feil mangler det ekspressionsdata for uke 6 fra de fem første pasientene.



Figur 8 Restgenekspressjon 1,5 timer post-dose ved 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon.

Grad av cytokinhemming korrelerte med takrolimus $C_{1,5}$ etter 1 uke ($r_s=0,72$; $P\leq 0,001$; $n=17$) (Figur 9). Ved takrolimus $C_{1,5}$ lavere enn $20 \mu\text{g/L}$ var det imidlertid mer enn 35-folds variasjon i cytokinresponsen, med RGE fra 2 til 69 % ($n=12$). De samme pasientene hadde også økning i takrolimuskonsentrasjon etter dose, normalisert til pre-dose, $\leq 11,2 \mu\text{g/L}$. Pasienter med takrolimuskonsentrasjon over $20 \mu\text{g/L}$ har konsentrasjonsøkning fra før til 1,5 timer etter dose på $\geq 14,8 \mu\text{g/L}$, i tillegg til at alle har RGE under 9 % (1,5-8,9 %). Det var

ikke lenger noen signifikant korrelasjon mellom takrolimuskonsentrasjon og genekspresjonsrespons etter 6 uker ($r_s=0,27$; $P=0,417$; $n=11$) og 1 år ($r_s=0,80$; $P=0,2$; $n=4$).

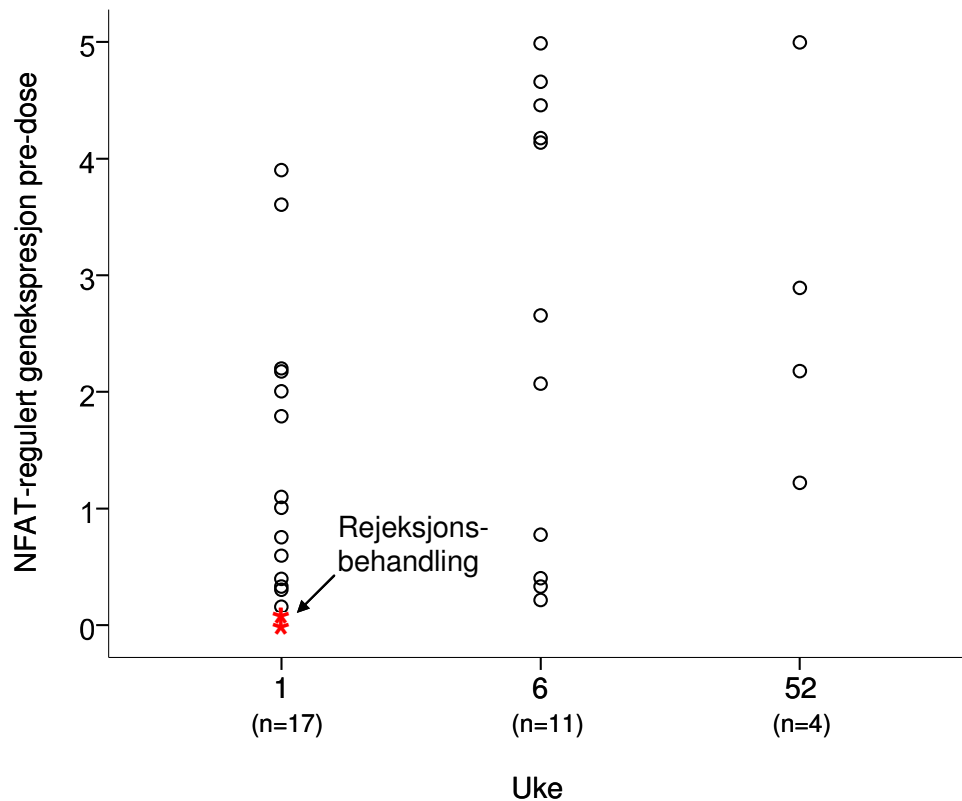


Figur 9 Korrelasjon takrolimuskonsentrasjon 1,5 timer etter dose versus restgenekspresjonen (RGE) etter 1 uke. Pasienter med takrolimuskonsentrasjon < 20 µg/L viser stor variasjon i restgenekspresjon, mens alle pasienter med konsentrasjon > 20 µg/L har RGE < 9 %. Takrolimuskonsentrasjon 20 µg/L er markert med grå linje.

4.4 Kliniske endepunkter

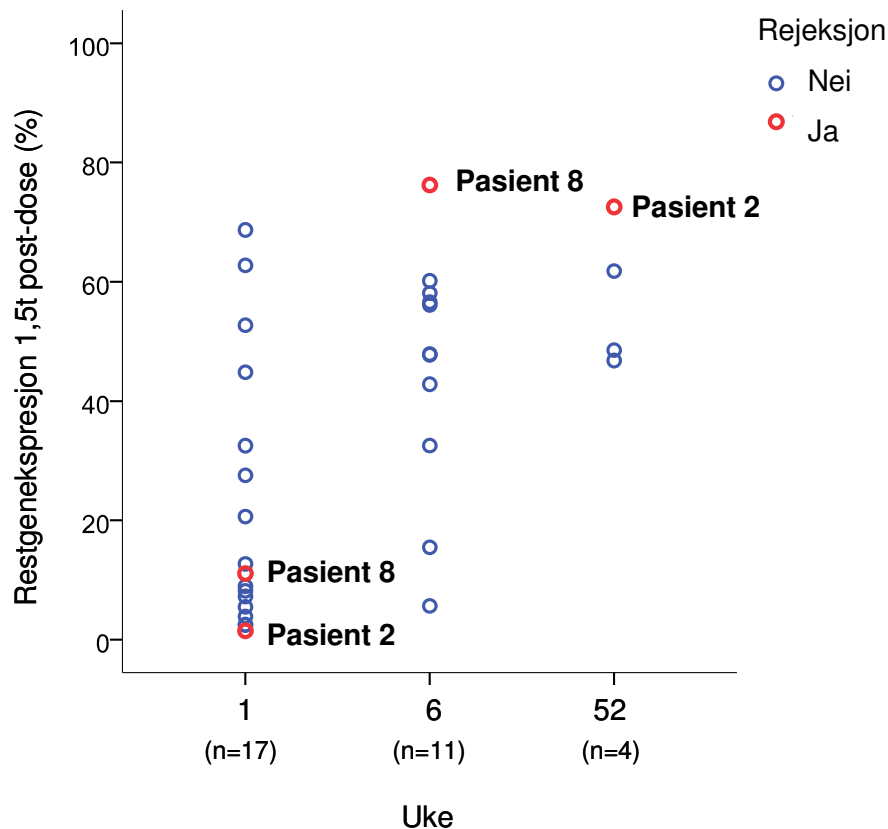
To pasienter opplevde akutt reaksjon i løpet av den første uken etter transplantasjon, og fikk reaksjonsbehandling ved prøvetaking etter 1 uke. Reaksjonsbehandlingen hos den ene pasienten bestod av høy-dose metylprednisolon og økning av takrolimusdose (Pasient 2), mens det for den andre bestod av høy-dose metylprednisolon med tillegg av ATG (Pasient 8).

Genekspresjon før dose og etter dose varierte i stor grad mellom pasientene, og for enkeltpasienter med tiden etter transplantasjon. Median cytokinekspressjon pre-dose for pasientene som fikk reaksjonsbehandling, var 0,035 (0,029-0,041; $n=2$) sammenlignet med median 1,01 (0,063-3,90; $n=16$) for pasientene uten reaksjonsbehandling, nesten 30 ganger lavere ($P\leq 0,05$) (Figur 10).



Figur 10 NFAT-regulert genekspressjon pre-dose hos individuelle pasienter 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon. De to pasientene som opplevde reaksjon i løpet av den første uken etter transplantasjon (markert med rødt) er under reaksjonsbehandling ved prøvetidspunkt 1 uke. Pasientene med reaksjonsbehandling hadde lavere nivåer av NFAT-regulerte cytokiner sammenlignet med de andre pasientene etter 1 uke.

Ved senere målinger, henholdsvis 6 uker (n=11) eller 1 år (n=4), hadde pasientene med tidligere reaksjonsepisoder (pasient 2 og 8) lavere cytokinhemming og høyere RGE sammenlignet med de andre pasientene ($P \leq 0,05$) (Figur 11). En protokollbiopsi ved 1-årskontrollen viste at pasient 2 i tillegg hadde en pågående subklinisk reaksjonsepisode. Takrolimus C_0 for denne pasienten var $4,0 \mu\text{g/L}$ og innenfor det terapeutiske målområdet, mens takrolimus $C_{1,5}$ var $4,7 \mu\text{g/L}$.



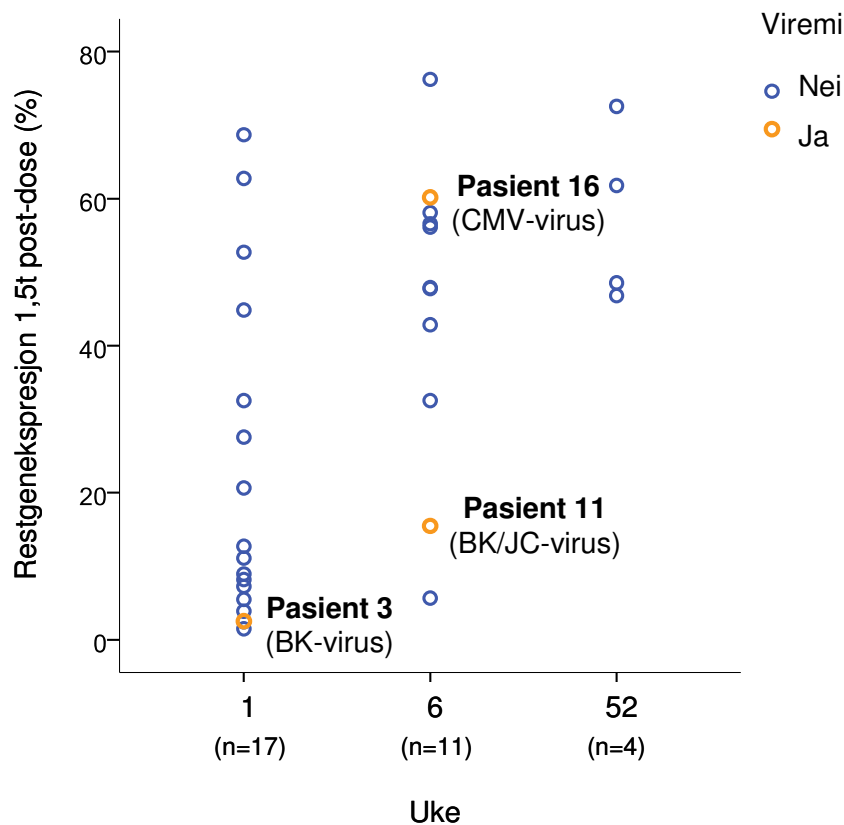
Figur 11 Restgenekspresjon av NFAT-regulerte cytokiner 1,5 timer etter dose hos individuelle pasienter 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon. To av pasientene opplevde en reaksjonsepisode i løpet av den første uken etter transplantasjon. Restgenekspresjonen for de to pasientene er markert med rødt, målingene etter 1 uke er gjort under pågående reaksjonsbehandling. Pasient 2 har en pågående subklinisk reaksjonsepisode ved prøvetaking etter 1 år.

Det ble påvist polyomavirus i blod hos to av pasientene. Hos pasient 3 ble det påvist BK-virus rundt 10 uker etter transplantasjon. Dette ble behandlet med reduksjon i takrolimus- og mykofenolat-dose. Rundt 16 uker etter transplantasjon utviklet den samme pasienten leukopeni.

Pasient 11 fikk påvist både polyoma BK- og JC-virus i blod rundt uke 10, og som følge av dette ble pasientens mykofenolat-dose redusert. Begge pasientene som fikk påvist polyomavirus, hadde kraftig hemming av cytokinekspressjon med RGE på 2,5 % og 15,5 % i forkant av viremieepisodene (pasient 3 og 11, Figur 12). Derimot hadde begge pasientene takrolimus C_0 innenfor det terapeutiske området, henholdsvis 4,3 og 5,2 $\mu\text{g/L}$.

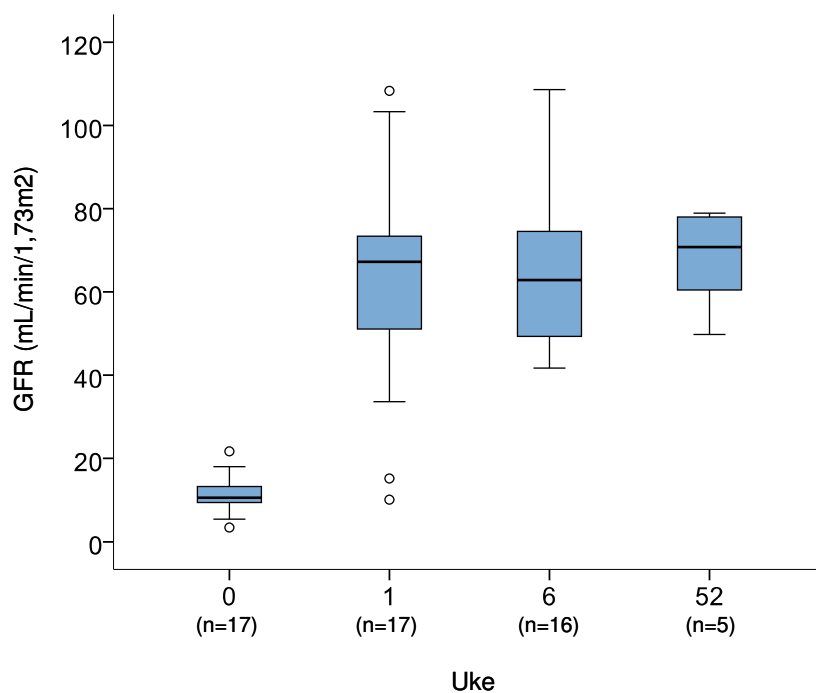
En tredje pasient som tidligere hadde fått rejeksjonsbehandling pga. mistenkt rejeksjon, utviklet senere CMV-infeksjon/viremi. Pasienten fikk behandling med valganciklovir (pasient 16, Figur 12). Pasienten var CMV-positiv (R+, resipient positiv) før transplantasjon og fikk nyre fra CMV-positiv donor (D+, donor positiv).

Totalt 12 av pasientene var CMV-positive før transplantasjon, hvorav ti pasienter også hadde CMV-positiv donor (D+). Tre pasienter var CMV-negative (R-) og fikk graft fra CMV-positiv donor (D+). Sistnevnte gruppe har høyere risiko for CMV-infeksjon, og får profylakse med valganciklovir.



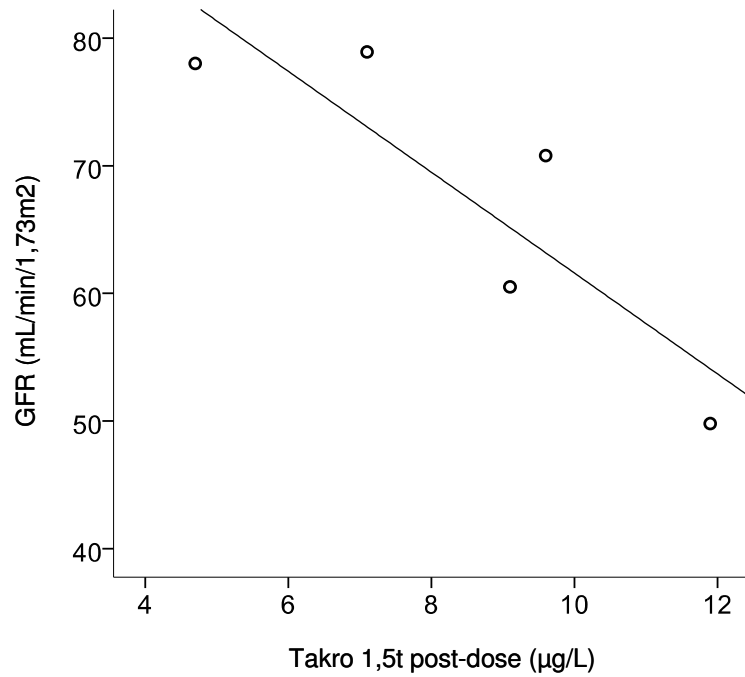
Figur 12 Restgenekspresjonen av NFAT-regulerte cytokiner 1,5 timer etter dose hos individuelle pasienter 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon. To pasienter opplevde polyomavirusviremi (pasient 3 og 11) og ytterligere én pasient opplevde CMV-reakivering/ny infeksjon (pasient 16). Genekspresjonsmålingen som ligger nærmest tidspunktet for viremien, er markert med oransje.

Før transplantasjon hadde pasientene median GFR 11 mL/min/1,73m² (3-22, n=17). 9 av pasientene var under dialysebehandling. GFR <15 og 15-30 mL/min/1,73m² klassifiseres som hhv. terminal nyresvikt (stadium 5) og alvorlig nedsatt nyrefunksjon (stadium 4) (79). Etter transplantasjon øker GFR signifikant til median 67 (10-108, n=17, P≤0,001), 63 (42-109, n=16) og 71 (50-79, n=5) ved hhv. 1, 6 og 52 uker (Figur 13). Variabiliteten i GFR er størst etter 1 uke hvor to pasienter fortsatt har alvorlig nedsatt nyrefunksjon.



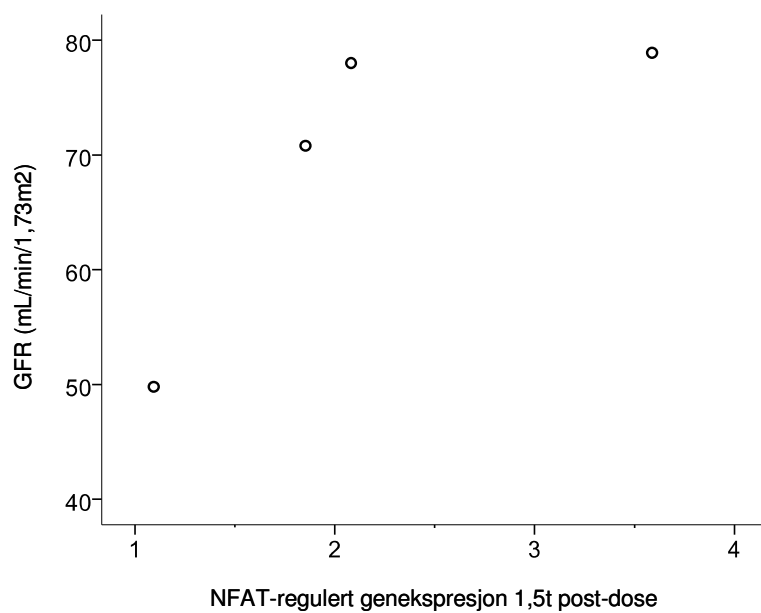
Figur 13 Estimert glomerulær filtrasjonshastighet (GFR) før transplantasjon, og 1, 6 og 52 uker etter transplantasjon.

For å undersøke eventuelle sammenhenger mellom takrolimuseksponering, cytokinrespons og nyretoksisitet, ble nyrefunksjon 1 år etter transplantasjon undersøkt i forhold til takrolimus C₀, C_{1,5} og NFAT-regulert genekspressjon. Ett år etter transplantasjon var det en sterk tendens til invers korrelasjon mellom GFR og takrolimus C_{1,5} (r = -0,866; P=0,057; n=5) (Figur 14). Det var imidlertid ingen signifikant korrelasjon mellom GFR og takrolimus C₀ (P=0,624).



Figur 14 Korrelasjon mellom takrolimuskonsentrasjon 1,5 timer etter dose og glomerulær filtasjonshastighet (GFR) etter 1 år.

I tillegg var det signifikant korrelasjon mellom GFR og NFAT-regulert genekspressjon 1,5 timer post-dose etter 1 år ($r_s = 1,000$; $P \leq 0,01$; $n = 5$) (Figur 15).



Figur 15 Korrelasjon mellom NFAT-regulert genekspressjon 1,5 timer etter dose og GFR etter 1 år.

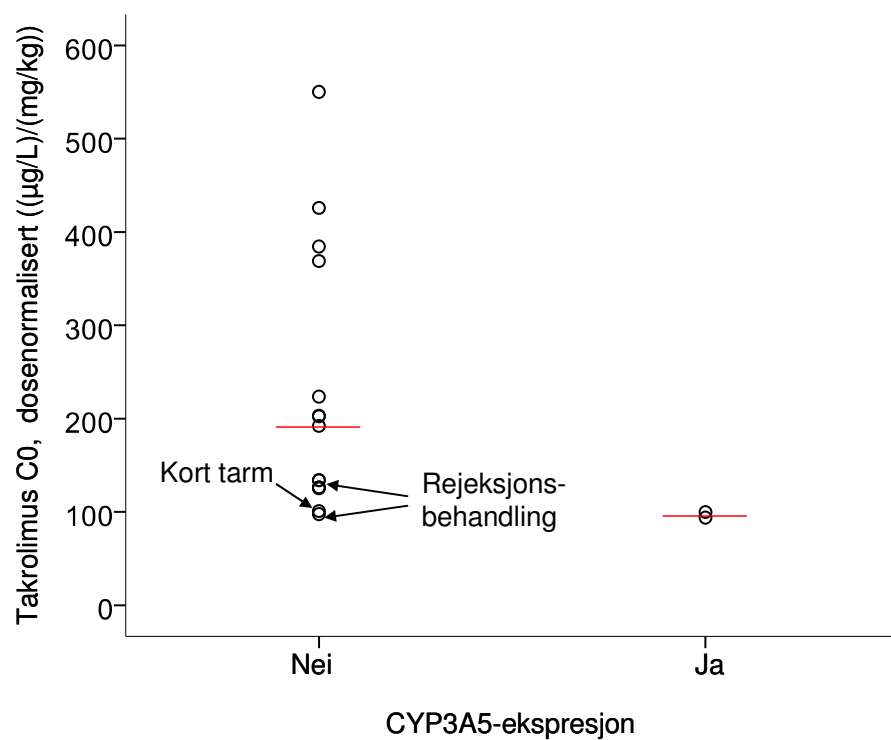
4.5 Genotyping av CYP3A-enzymmer

Blant 17 pasienter var én pasient heterozygot for både *CYP3A5*1* og *CYP3A4*22*, og én pasient var heterozygot for bare *CYP3A5*1*-allelet (Tabell 9).

Tabell 9 *CYP3A4*- og *CYP3A5*-genotyper (n=17)

	<i>CYP3A5*3/*3</i>	<i>CYP3A5*1/*3</i>
<i>CYP3A4*1/*1</i>	15	1
<i>CYP3A4*1/*22</i>	0	1

Dosenormalisert takrolimuskonsentrasjon pre-dose etter 1 uke var 93,9 ($\mu\text{g/L}$)/(mg/kg) hos pasienten som var heterozygot for både *CYP3A5*1*- og *CYP3A4*22*-allelene, og 99,9 ($\mu\text{g/L}$)/(mg/kg) hos pasienten som var heterozygot bare for *CYP3A5*1*-allelet (Figur 16). Konsentrasjonene var signifikant lavere enn for pasientene som ikke uttrykker *CYP3A5* (median 96,9 vs. 192,2; $P \leq 0,05$; n=17). To andre pasienter som ikke uttrykker *CYP3A5* ligger omtrent like lavt i konsentrasjon (97,7 og 101,0 ($\mu\text{g/L}$)/(mg/kg)). Den ene av disse pasientene er under reaksjonsbehandling med høye doser glukokortikoider, og den andre har kort tarm-syndrom. Pasienten som fikk reaksjonsbehandling med høye doser glukokortikoider og ATG, hadde takrolimuskonsentrasjon på 133,8 ($\mu\text{g/L}$)/(mg/kg).



Figur 16 Dosenormalisert takrolimuskonsentrasjon pre-dose ved 1 uke for pasienter med og uten uttrykk av funksjonelt CYP3A5-enzym (CYP3A5*1-allel). Takrolimuskonsentrasjonene for pasientene med kort tarm-syndrom og rejeksjonsbehandling med høy-dose glukokortikoider er markert med piler. Medianverdi for gruppen med og uten CYP3A5-uttrykk er markert med røde linjer.

5 Diskusjon

CNI inngår i dag som et av de viktigste og mest effektive legemidlene i immunsuppressive regimer etter organtransplantasjon. Hovedutfordringen med bruk av CNI er at de har et smalt terapeutisk vindu, og variabel farmakodynamikk og farmakokinetikk. Langtidsbruk er assosiert med alvorlige bivirkninger som nyretoksisitet, infeksjoner, malignitet og økt risiko for kardiovaskulære hendelser (26). Død med funksjonelt graft er en av de vanligste årsakene til grafttap (80).

Til tross for at det er gjort en rekke studier for å finne bedre immunsupprimerende behandling med mindre alvorlige langtidsbivirkninger, har man ikke lyktes i å finne effektive legemidler som kan erstatte CNI. Utfordringene med CNI-behandlingen har ført til at individualisert legemiddelmonitorering har fått mye fokus som en potensiell strategi for å bedre langtidsutfall hos organtransplanterte pasienter.

I dag monitoreres CNI vanligvis basert på legemiddelkonsentrasjoner i fullblod pre-dose. Farmakokinetiske målinger reflekterer imidlertid ikke nødvendigvis den biologiske effekten i immunceller, og det er foreslått at farmakodynamisk monitorering kan være en bedre tilnæringsmetode (50,59,63,68). NFAT-regulert genekspressjon har vist seg å være en lovende metode for farmakodynamisk monitorering av CNI (50). De fleste av studiene har imidlertid undersøkt nyretransplanterte pasienter som behandles med CsA i stabil fase, flere år etter transplantasjonen. Studier har vist at takrolimus gir færre tilfeller av akutt rejeksjon sammenlignet med CsA. Som følge av dette har bruken av takrolimus økt i forhold til CsA, og takrolimus er i dag foretrukket CNI ved de fleste transplantasjonssentre (15,17). Selv om CsA og takrolimus har antatt lik virkningsmekanisme, er det også forskjeller mellom de to legemidlene. Resultater fra studier på CsA er derfor ikke nødvendigvis overførbare til takrolimus, og det er behov for flere studier av NFAT-regulert genekspressjon ved takrolimusbehandling.

Dette masterprosjektet har hatt fokus på nyretransplanterte pasienter som behandles med takrolimus i tidlig fase (≤ 1 år) etter transplantasjon. NFAT-regulert genekspressjon har blitt undersøkt som en potensiell farmakodynamisk markør ved å sammenligne genekspressjon med kliniske utfall. I tillegg ble takrolimuseksponering undersøkt i forhold til pasientens *CYP3A5*- og *CYP3A4*-genotype.

5.1 Pilotstudie

Mange studier har rapportert at konsentrasjon pre-dose ikke er et godt nok mål på klinisk utfall av CNI-behandling (81-85). Til tross for at nesten alle pasientene i pilotstudien hadde takrolimus C_0 innenfor terapeutisk område (3-7 $\mu\text{g/L}$ og 3-5 $\mu\text{g/L}$) etter 1, 6 og 52 uker, var det stor variasjon i klinisk respons. To pasienter opplevde reaksjon, mens tre andre pasienter fikk viremi til tross for takrolimuskonsentrasjoner i det terapeutiske området.

Flere har foreslått at maksimal blodkonsentrasjon av CNI vil reflektere legemiddeleksponeringen bedre enn C_0 , og dermed kanskje også i større grad predikere klinisk respons (71,73,81,86). Funnene ved bruk av C_{maks} -monitorering er imidlertid motstridende mellom studier. I tillegg til at C_{maks} -monitorering er mer upraktisk med hensyn til prøvetaking, er det stor individuell variasjon i tiden det tar før man oppnår maksimal blodkonsentrasjon. Monitorering av C_{maks} er derfor vanligvis ikke betraktet som førstevalg for farmakokinetisk monitorering av CNI (87). I motsetning til takrolimus C_0 var det en betydelig variasjon i takrolimus $C_{1,5}$ mellom pasientene i pilotstudien. Variasjonen i konsentrasjoner var tydeligst etter 1 uke, mens det var tendens til mindre variasjon og lavere takrolimus $C_{1,5}$ 6 uker og 1 år etter transplantasjon. Det ble spekulert i om reduksjonen i takrolimus-konsentrasjonen 1,5 timer etter dose var forårsaket av overgang til depotformulering (Advagraf®). Det viste seg imidlertid at bare én av pasientene hadde gått over til Advagraf ved prøvetidspunktet etter 6 uker. Det var heller ingen signifikante forskjeller i takrolimusdose fra uke 1 til uke 6.

Den tilsynelatende reduksjonen av takrolimus $C_{1,5}$ kan være relatert til forandringer i absorpsjonshastighet som bl.a. påvirkes av gastrointestinal motilitet og doseringstidspunkt i forhold til måltider. Det er rapportert at farmakokinetikken kan påvirkes av hematokritnivåer (88). Videre vil en eventuell økning av aktiviteten til metabolismeenzymer og legemiddeltransportører både kunne redusere biotilgjengeligheten og øke eliminasjonen av takrolimus. Derimot avhenger eliminasjon av takrolimus i liten grad av nyrefunksjon (89).

Funnene våre avviker imidlertid fra resultatene fra tidligere studier som har vist en reduksjon i dosebehov for å opprettholde en bestemt pre-dose konsentrasjon (90-93). Det er kjent at høye doser glukokortikoider kan indusere uttrykket av bl.a. CYP3A-enzymet og P-gp (ABCB1), og det har blitt foreslått at reduksjonen i dosebehov med tiden etter transplantasjon skyldes redusert clearance eller økt biotilgjengelighet av takrolimus (88). Den observerte endringen i

farmakokinetikk i pilotstudien må bekreftes og undersøkes nærmere i større pasientpopulasjoner.

Cytokinekspresjonen målt før takrolimusdosering varierte betydelig mellom pasientene i pilotstudien. Til tross for dette ble det hos de fleste pasientene observert en kraftig hemming av genekspressjonen 1 uke etter transplantasjon. Over halvparten av pasientene hadde RGE lavere enn 20 %, noe som har blitt assosiert med økt risiko for virusinfeksjon ved takrolimusbehandling (72). Etter 6 uker og 1 år var det imidlertid tendens til mindre hemming av cytokinekspresjon med median RGE på henholdsvis 48 og 55 % sammenlignet med median 11 % uke 1. Dette kan trolig delvis forklares med lavere takrolimus $C_{1,5}$. Korrelasjonen mellom takrolimuseksponering og RGE er imidlertid dårlig i konsentrasjonsområdet som ble observert ved uke 6 og etter 1 år, og andre faktorer er sannsynligvis også av betydning for endringen i farmakodynamisk respons med tiden etter transplantasjon.

RGE etter 6 uker og 1 år ser ut til å være høyere enn rapportert i tidligere studier, men dette kan også ha sammenheng med bruk av lavere takrolimusdosering i dagens protokoller. Sommerer *et al.* fant i en studie at median RGE hos pasienter 6-36 måneder etter transplantasjon, var 21 % (1-84, n=73) (72). I en annen studie med pasienter 0-216 måneder etter transplantasjon, var median RGE på 26 % (0-138, n=262) (71).

Det er gjennomført få studier som fokuserer på farmakodynamikk hos nyretransplanterte pasienter i tidlig fase etter transplantasjon. Mortensen *et al.* sammenlignet kalsineurinaktivitet etter to uker og fem år hos nyretransplanterte som ble behandlet med takrolimus. Terapeutisk takrolimuskonsentrasjon viste kraftigere hemming rett etter transplantasjon, sammenlignet med konsentrasjon fem år etter (94).

De fleste tidligere studier har undersøkt NFAT-regulert genekspressjon blant pasienter som har fått høyere CNI-dose enn det pasientene i denne studien har fått. For få år siden ble retningslinjene for CNI-dosering endret som følge av rapportering om at CNI-lavdose var like effektivt som høy-dose. Ekberg *et al.* viste i en stor prospektiv studie at kvadruppelt legemiddelregime med daclizumab, mykofenolat, kortikosteroider og lav-dose takrolimus (3-7 µg/L) gav bedre graftoverlevelse etter 1 år enn standard-dose CsA, og bedre GFR, færre rejeksjoner og bedre graftoverlevelse sammenlignet med lavdose-CsA eller -sirolimusbaserte regimer (95). Tilsvarende resultater ble observert etter 3 år (31).

Tidligere studier har funnet korrelasjon mellom RGE og takrolimuskonsentrasjon 1,5 timer etter legemiddelinntak (71,72). Dette samsvarer med resultatene fra vår studie, hvor RGE er inverst korrelert med takrolimus $C_{1,5}$ etter 1 uke. Våre data viser imidlertid at det ved takrolimus $C_{1,5}$ under $20 \mu\text{g/L}$ er mer enn 35 ganger forskjell i RGE mellom pasientene (2-69 %). Pasientene med takrolimuskonsentrasjon over $20 \mu\text{g/L}$ og konsentrasjonsøkning på $\geq 14,8 \mu\text{g/L}$, har derimot alle RGE under 9 %. Dette stemmer godt overens med en studie som viste at en økning av takrolimuskonsentrasjon mindre enn $11,4 \mu\text{g/L}$ bare hadde delvis eller manglende NFAT-hemming, mens pasientene med større økning i takrolimuskonsentrasjon hadde kraftig hemming (71).

Dersom det hadde vært perfekt korrelasjon mellom takrolimus $C_{1,5}$ og cytokinrespons, ville det ikke være noe poeng å monitorere farmakodynamisk respons. Korrelasjonen er imidlertid dårlig og de individuelle forskjellene i hemming av cytokinekspresjon er store ved de laveste takrolimuskonsentrasjonene. Flere studier har antydnet at mange pasienter som behandles med CNI, er overimmunsupprimert (65,66).

Lav takrolimuskonsentrasjon er trolig gunstig for å minimere toksisitet, men risikoen for reaksjon vil være større. Dersom det er mulig å definere et optimalt område for RGE, kan måling av cytokinhemming bli et nyttig verktøy for å identifisere over- eller underimmunsupprimerte pasienter som kan ha nytte av dosejustering. Til tross for takrolimuskonsentrasjoner innenfor det terapeutiske området, kan en pasient med høy RGE, dvs. liten cytokinhemming, kanskje ha nytte av høyere dosering for å unngå reaksjon.

En uke etter transplantasjonen, hadde de to pasientene som opplevde reaksjon, svært kraftig cytokinhemming med RGE på 1 og 11 % 1,5 timer etter dose. I tillegg hadde pasientene lavere cytokinekspresjon før dose sammenlignet med pasientene uten reaksjon. På dette tidspunktet fikk begge pasientene reaksjonsbehandling med høy-dose metylprednisolon, samt ATG for en av pasientene. Dette gir en kraftig generell immunsuppressiv effekt som trolig også har innvirkning på NFAT-regulert cytokinekspresjon. Ved de senere prøvetidspunktene hadde de to pasientene med tidligere reaksjonsepisoder lavere cytokinhemming enn de andre pasientene, med RGE på henholdsvis 76 % (ved 6 uker) og 73 % (ved 1 år). Ved ett-årskontrollen viste det seg at en av pasientene med lav cytokinhemming og tidligere reaksjon hadde en ny pågående subklinisk reaksjon. Dette kan tyde på at pasientene med reaksjon og lav cytokinhemming har en lavere sensitivitet for CNI, og derfor kanskje har fått for lav

takrolimusdosering til tross for at takrolimuskonsentrasjonen har vært innenfor det terapeutiske området.

De to pasientene som fikk polyomavirusviremi, hadde begge kraftig hemming (> 84 %) av cytokinenekspressjonen ved prøvetidspunktet som var nærmest viremiepisoden. Hos den ene av disse pasientene ble det i tillegg påvist leukopeni, som også er assosiert med overimmunsuppresjon (96). Pasienten som opplevde CMV-infeksjon/viremi hadde imidlertid liten grad av cytokinhemming, med RGE på 60 % ved prøvetidspunktet nærmest episoden rundt fem uker etter transplantasjon. Pasientens CMV-serostatus var D+/R+ (donor positiv og resipient positiv) før transplantasjon. Dette innebærer mindre risiko for CMV-viremi sammenlignet med D+/R-. Pasienten opplevde flere komplikasjoner etter transplantasjonen, noe som kan ha hatt innvirkning på klinisk utfall. På grunn av klinisk mistanke om rejeksjon, fikk pasienten rejeksjonsbehandling med metylprednisolon før biopsi av graftet viste at det ikke var rejeksjon. Rejeksjonsbehandling med glukokortikoider har tidligere blitt assosiert med økt risiko for reaktivering av CMV (97), og det er mulig at rejeksjonsbehandlingen har bidratt til reaktiveringen av CMV eller risiko for ny infeksjon hos denne pasienten. Den samme pasienten ble også reoperert noen dager etter transplantasjon på grunn av tekniske komplikasjoner med graftet. Reoperering vil ofte føre til en inflammasjon, noe som også har blitt assosiert med økt risiko for CMV-reaktivering (98). HLA mismatch-status for pasienten var 4-2, basert på matching med henholdsvis HLA-A/HLA-B og HLA-DR, dvs. dårligste mulig match. Forskjeller i tidspunkt for måling av cytokinenekspressjon og viremi innebærer at genekspressjonsmålingene ikke nødvendigvis reflekterer immunstatus ved tidspunktet for virusreaktivering eller -infeksjon.

For CsA har det blitt foreslått at optimal cytokinhemming bør ligge i området mellom 15 og 30 % RGE (65,69). Det er i imidlertid flere studier som har rapportert at NFAT-regulerte cytokiner hemmes i mindre grad av takrolimus enn av CsA, samtidig som dette ikke ser ut til å påvirke terapeutisk effekt (71,71). Tidligere studier med takrolimusbehandlede pasienter har vist at RGE over 30 % er assosiert med økt risiko for rejeksjon (71). Pasientene som behandles med takrolimus, viser generelt relativt lav hemming av cytokinenekspressjon allerede få uker etter transplantasjon. Etter 6 uker eller 1 år var RGE > 30 % blant 13 av 15 pasienter og 7 av 15 pasienter har RGE over 56 %. Den først uken etter transplantasjon hadde tre av pasientene RGE over 50 % uten tegn til avstøtning. Dette kan tyde på at det optimale RGE-området for takrolimus kan være høyere enn hva som er foreslått for CsA. Optimal

cytokinrespons kan også variere avhengig av pasientpopulasjon, immunologisk risiko og immundepende regime.

I en studie er det sett at noen av pasientene som får takrolimusbehandling viser liten hemming av NFAT-regulerte gener til tross for at de ikke opplever rejeksjon (71). Den hemmende effekten som CsA har på kalsineurin, ser ikke ut til å ha like stor betydning for effekten til takrolimus (99). Det har vært spekulert i om takrolimus, i tillegg til hemming av kalsineurin, også medierer immundepende effekter via andre intracellulære mekanismer (50).

Studier som har sammenlignet CNI og NFAT-regulert genekspressjon, har vist at pasienter med liten hemming av NFAT-regulert genekspressjon har signifikant bedre nyrefunksjon enn pasienter med sterk hemming (69,71). Lavere CNI-konsentrasjon har også vist sammenheng med bedre nyrefunksjon (31). De første ukene etter transplantasjon vil nyrefunksjonen være påvirket av mange faktorer, som ulik grunnsykdom, immunstatus, alder på donor, iskemitid og mekaniske komplikasjoner etter tilkobling av nyren. Risikoen for irreversibel CNI-nyretoksisitet er liten etter bare 1 og 6 uker, og vi undersøkte derfor nyrefunksjonen til pasientene 1 år etter transplantasjon i forhold til NFAT-regulert genekspressjon og takrolimuskonsentrasjon. Til tross for få pasientprøver 1 år etter transplantasjon, ser det ut til at både takrolimus $C_{1,5}$ og NFAT-regulert genekspressjon korrelerer med GFR. Pasienten som har lavest GFR, har høyest takrolimuskonsentrasjon og lavest NFAT-regulert genekspressjon 1,5 timer etter dose. Korrelasjon mellom nyrefunksjon og både takrolimuskonsentrasjon og NFAT-regulert genekspressjon, kan tyde på at den nyretoksiske effekten av takrolimus er mediert, i hvert fall delvis, via kalsineurinhemming.

Risiko for rejeksjon er størst de første dagene etter transplantasjon, og det er viktig å oppnå optimal takrolimuseksponering fra start (100). Det finnes i dag omfattende bevis for at takrolimusdosebehov påvirkes av *CYP3A*-genvarianter (41,49,100). Blant genvariantene er det *CYP3A5*3*-allelet (vs. *CYP3A5*1*) som er rapportert å ha størst betydning for dosebehov. Genotyping av *CYP3A5* før transplantasjon har blitt foreslått som en strategi for å predikere terapeutisk startdose bedre (101). Senere studier har vist at *CYP3A4*22*-allelet også ser ut til å spille en rolle for takrolimus farmakokinetikk og dermed dosebehov (42).

I vår pilotstudie var det to pasienter som uttrykte funksjonelt *CYP3A5*-enzym (heterozygot for *CYP3A5*1*-allel). Én av disse var i tillegg heterozygot for *CYP3A4*22*. Pasientene med *CYP3A5*-uttrykk hadde signifikant lavere dosenormalisert takrolimus pre-dosekonsentrasjon

etter 1 uke, dvs. at de har økt dosebehov i forhold til gruppen uten CYP3A5-uttrykk. Det er imidlertid også pasienter uten CYP3A5-uttrykk som har lav takrolimuseksponering. Tre av pasientene som lå lavest blant pasientene som ikke uttrykker CYP3A5, hadde kliniske tilstander som kan påvirke dosebehovet. Én av pasientene hadde kort tarm-syndrom, som vil ha påvirkning for absorpsjon av takrolimus. To andre pasienter var under rejsjonsbehandling og fikk høydose metylprednisolon. Flere studier har vist at glukokortikoider, spesielt i høye doser, kan indusere CYP-enzymet og legemiddeltransportører som P-gp. Dette vil igjen kunne gi økt dosebehov (102,103).

*CYP3A4*22*-allelet har blitt assosiert med redusert CYP3A4-enzymaktivitet. I en studie så man at pasienter som uttrykte *CYP3A4*22*-allel hadde gjennomsnittlig dosebehov som var 33 % lavere enn de med *CYP3A4*1/1*, og effekten viste seg å være uavhengig av *CYP3A5*3*-allelstatus (55). Det ble derfor spekulert i om *CYP3A4*22*-allelet ville redusere effekten av *CYP3A5*1*-allelet hos pasienten med *CYP3A5*1/3* og *CYP3A4*1/22* genotype. Dosenormalisert takrolimuskonsentrasjon var svært lik for begge pasientene med CYP3A5-uttrykk og uavhengig av *CYP3A4*22*-allel. Dette tyder på at *CYP3A5*1*-allelet er av størst betydning når det gjelder takrolimusmetabolisme hos pasienter med både *CYP3A4*22* og *CYP3A5*1*-allel.

Resultatene i mastergradsprosjektet er basert på en interimanalyse av data som var tilgjengelige t.o.m. april 2013. De foreløpige resultatene begrenses av at studien involverer få pasienter, og at oppfølgingstiden varierer. De fleste pasientene har ennå ikke blitt fulgt ett år, og det er mulig at pasientene opplever flere rejsjonsepisoder, infeksjoner eller andre komplikasjoner i løpet av oppfølgingstiden.

5.2 Fremtidsutsikter

Det gjenstår å inkludere ytterligere 13 pasienter i pilotstudien, og å følge opp alle pasientene i ett år. Dette vil gi mer data, og mulighet til å bedre karakterisere sammenheng mellom RGE og takrolimus i tidlig fase etter transplantasjon. Cytokinekspresjon skal sammenlignes med kliniske data, som rejsjon, infeksjoner, malignitet og andre legemiddelspesifikke bivirkninger.

Farmakodynamisk monitorering basert på NFAT-regulert genekspressjon, kan bidra til ytterligere individualisering av CNI-dosering. Før farmakodynamisk monitorering kan implementeres i klinisk praksis, er det imidlertid nødvendig å definere terapeutiske målområder, finne en optimal monitoreringsstrategi og identifisere interfererende faktorer. For transplanterte pasienter i stabil fase har det blitt foreslått at NFAT-regulert cytokinrespons måles f.eks. en gang per år i kombinasjon med hyppigere farmakokinetisk monitorering (50).

En nyere studie har konkludert med at anbefalte RGE-nivåer som er foreslått for CsA, ikke nødvendigvis gjelder for takrolimus. Det må derfor defineres nye referanseområder for RGE blant pasienter som behandles med takrolimus (73). Hemming av cytokinrespons ser ut til å være kraftigst de første ukene etter transplantasjon. Det trengs derfor flere studier som undersøker cytokinresponsen i tidlig fase etter transplantasjon, hvor risikoen for reaksjoner og infeksjoner er størst. Det vil også være behov for studier som undersøker mulige effekter av andre legemidler på NFAT-regulert genekspressjon, spesielt med hensyn på glukokortikoider (50). Videre så bør den kliniske nytteverdien av farmakodynamisk monitorering kartlegges i ulike pasientpopulasjoner. En pålitelig farmakodynamisk analyse for CNI-dosering vil kunne bli et viktig verktøy og et viktig skritt fremover for CNI-monitorering for langtidsoppfølging av organtransplanterte.

6 Konklusjon

Muligheten for ytterligere individualisering av takrolimusbehandling ved farmakodynamiske og farmakogenetiske analyser har blitt undersøkt i en pågående pilotstudie som foreløpig inkluderer 17 nyretransplanterte pasienter. Farmakodynamisk respons, målt som NFAT-regulert genekspressjon, har blitt sammenlignet med takrolimuskonsentrasjon og kliniske data. I tillegg ble takrolimus dosebehov undersøkt i forhold til genvarianter som kan påvirke CYP3A-enzymaktivitet.

Til tross for at takrolimuskonsentrasjonen pre-dose var innenfor terapeutisk område, var det stor variabilitet i takrolimuskonsentrasjon etter 1,5 timer, hemming av cytokinekspressjon og klinisk utfall mellom pasientene. Pasienter som uttrykte CYP3A5-enzymet, hadde lavere dosenormalisert takrolimuskonsentrasjon og økt dosebehov.

Resultatene fra pilotstudien støtter teorien om at måling av NFAT-regulert genekspressjon kan være en lovende metode for ytterligere individualisering av CNI-behandling. Funnene kan også bidra med nyttig informasjon i forbindelse med etablering av en strategi for farmakodynamisk monitorering av takrolimus. Informasjon om *CYP3A5*-genotype kan være nyttig for å predikere nødvendig CNI-dose, særlig ved oppstart av behandling.

Bruk av farmakodynamiske og farmakogenetiske analyser, i tillegg til tradisjonell farmakokinetisk monitorering, kan bidra til ytterligere individualisering av CNI-behandling. Dette vil igjen kunne bidra til å forbedre de kliniske langtidsresultatene etter transplantasjon. Kunnskapen om NFAT-regulert genekspressjon under takrolimusbehandling og i tidlig fase etter nyretransplantasjon, er imidlertid begrenset. Det trengs mer kunnskap om målområder for hemming av cytokinekspressjon, interfererende faktorer og ulike pasientpopulasjoner før klinisk nytteverdi kan bekreftes, og analysen kan implementeres i klinisk praksis.

Litteraturliste

1. Thorsby, E. (2006). "[Transplantation medicine in Norway through 50 years]." Tidsskr Nor Laegeforen. 126: 3305-3310.
2. Årsrapport, organdonasjon og transplantasjon.
<http://www.oslo-universitetssykehus.no/SiteCollectionDocuments/Om%20oss/Avdelinger/Spesialisert%20medisin%20og%20kirurgi/4%20kvartal%202011.pdf> (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
3. Reisaeter, A.V., Foss, A., Hartmann, A., Leivestad, T., Midtvedt, K. (2011). "The kidney transplantation program in Norway since 2000." Clin Transpl. 111-118.
4. Annual Report 2011, The Norwegian Renal Registry.
<http://www.nephro.no/registry.html> (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
5. Clark, B., Unsworth, D.J. (2010). "HLA and kidney transplantation." J Clin Pathol. 63: 21-25.
6. Opelz, G., Dohler, B. (2007). "Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades." Transplantation. 84: 137-143.
7. Morris, P.J., Johnson, R.J., Fuggle, S.V., Belger, M.A., Briggs, J.D. (1999). "Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA)." Lancet. 354: 1147-1152.
8. Parham, P., Janeway, C.A. (2009). "The immune system." Garland Science, London.
9. Shimmura, H., Tanabe, K., Ishida, H., Miyamoto, N., Tokumoto, T., Ishikawa, N., et al. (2006). "Long-term results of living kidney transplantation from HLA-identical sibling donors under calcineurin inhibitor immunosuppression." Int J Urol. 13: 502-508.
10. Protokoll for nyre-transplantasjon og pancreas-transplantasjon.
www.nephro.no (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
11. Solez, K., Colvin, R.B., Racusen, L.C., Haas, M., Sis, B., Mengel, M., et al. (2008). "Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions." Am J Transplant. 8: 753-760.
12. de Fijter, J.W. (2010). "Rejection and function and chronic allograft dysfunction." Kidney Int Suppl. S38-S41.
13. Vanikar, A.V., Trivedi, H.L. (2007). "Chronic rejection: an enduring enigma of transplantation biology." Transplant Proc. 39: 773-778.

14. Claas, F.H., Doxiadis, I.I. (2009). "Management of the highly sensitized patient." *Curr Opin Immunol.* 21: 569-572.
15. Lee, R.A., Gabardi, S. (2012). "Current trends in immunosuppressive therapies for renal transplant recipients." *Am J Health Syst Pharm.* 69: 1961-1975.
16. Duncan, M.D., Wilkes, D.S. (2005). "Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections." *Proc Am Thorac Soc.* 2: 449-455.
17. Halloran, P.F. (2004). "Immunosuppressive drugs for kidney transplantation." *N Engl J Med.* 351: 2715-2729.
18. Holdaas, H., Midtvedt, K., Asberg, A. (2012). "A drug safety evaluation of everolimus in kidney transplantation." *Expert Opin Drug Saf.* 11: 1013-1022.
19. Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B., Gurkan, A., et al. (2007). "Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation." *N Engl J Med.* 357: 2562-2575.
20. Augustine, J.J., Bodziak, K.A., Hricik, D.E. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." *Drugs.* 67: 369-391.
21. Campistol, J.M., de Fijter, J.W., Nashan, B., Holdaas, H., Vitko, S., Legendre, C. (2011). "Everolimus and long-term outcomes in renal transplantation." *Transplantation.* 92: S3-26.
22. Webster, A.C., Playford, E.G., Higgins, G., Chapman, J.R., Craig, J.C. (2004). "Interleukin 2 receptor antagonists for renal transplant recipients: a meta-analysis of randomized trials." *Transplantation.* 77: 166-176.
23. Hariharan, S., Johnson, C.P., Bresnahan, B.A., Taranto, S.E., McIntosh, M.J., Stablein, D. (2000). "Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996." *N Engl J Med.* 342: 605-612.
24. Meier-Kriesche, H.U., Schold, J.D., Srinivas, T.R., Kaplan, B. (2004). "Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era." *Am J Transplant.* 4: 378-383.
25. Williams, C.R., Gooch, J.L. (2012). "Calcineurin inhibitors and immunosuppression - a tale of two isoforms." *Expert Rev Mol Med.* 14: e14.
26. Marcen, R. (2009). "Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection." *Drugs.* 69: 2227-2243.
27. Ekberg, H. (2008). "Calcineurin inhibitor sparing in renal transplantation." *Transplantation.* 86: 761-767.
28. Vincenti, F., Larsen, C., Durrbach, A., Wekerle, T., Nashan, B., Blanco, G., et al. (2005). "Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation." *N Engl J Med.* 353: 770-781.

29. Charpentier, B. (2012). "Belatacept: a novel immunosuppressive agent for kidney transplant recipients." *Expert Rev Clin Immunol.* 8: 719-728.
30. Kjære helsepersonell-brev - sikkerhetsdata, Nulojix.
http://www.legemiddelverket.no/Bivirkninger/helsepersonell-brev/helsepersonell-brev_utsendt/Sider/default.aspx (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
31. Ekberg, H., Bernasconi, C., Tedesco-Silva, H., Vitko, S., Hugo, C., Demirbas, A., et al. (2009). "Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony study: observational results 3 years after transplantation." *Am J Transplant.* 9: 1876-1885.
32. Knoll, G.A., Bell, R.C. (1999). "Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials." *BMJ.* 318: 1104-1107.
33. Matas, A.J., Gillingham, K.J., Payne, W.D., Najarian, J.S. (1994). "The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2)." *Transplantation.* 57: 857-859.
34. Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., et al. (1987). "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics." *J Antibiot (Tokyo).* 40: 1249-1255.
35. Starzl, T.E., Todo, S., Fung, J., Demetris, A.J., Venkataramman, R., Jain, A. (1989). "FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation." *Lancet.* 2: 1000-1004.
36. Chan, L., Gaston, R., Hariharan, S. (2001). "Evolution of immunosuppression and continued importance of acute rejection in renal transplantation." *Am J Kidney Dis.* 38: S2-S9.
37. SPC Prograf.
www.legemiddelverket.no (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
38. Kaplan, B., Burckart, G.J., Lakkis, F.G. (2012). "Immunotherapy in transplantation : principles and practice." Wiley-Blackwell, Chichester.
39. Bekersky, I., Dressler, D., Mekki, Q.A. (2001). "Effect of low- and high-fat meals on tacrolimus absorption following 5 mg single oral doses to healthy human subjects." *J Clin Pharmacol.* 41: 176-182.
40. Kuehl, P., Zhang, J., Lin, Y., Lamba, J., Assem, M., Schuetz, J., et al. (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression." *Nat Genet.* 27: 383-391.
41. Wallemacq, P., Armstrong, V.W., Brunet, M., Haufroid, V., Holt, D.W., Johnston, A., et al. (2009). "Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference." *Ther Drug Monit.* 31: 139-152.

42. Elens, L., van Schaik, R.H., Panin, N., de, M.M., Wallemacq, P., Lison, D., et al. (2011). "Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients." *Pharmacogenomics*. 12: 1383-1396.
43. Norsk legemiddelhåndbok.
www.legemiddelhandboka.no (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).
44. Fishman, J.A. (2007). "Infection in solid-organ transplant recipients." *N Engl J Med*. 357: 2601-2614.
45. Mahalati, K., Belitsky, P., Sketris, I., West, K., Panek, R. (1999). "Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation." *Transplantation*. 68: 55-62.
46. Levy, G., Thervet, E., Lake, J., Uchida, K. (2002). "Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement." *Transplantation*. 73: S12-S18.
47. Morris, R.G., Russ, G.R., Cervelli, M.J., Juneja, R., McDonald, S.P., Mathew, T.H. (2002). "Comparison of trough, 2-hour, and limited AUC blood sampling for monitoring cyclosporin (Neoral) at day 7 post-renal transplantation and incidence of rejection in the first month." *Ther Drug Monit*. 24: 479-486.
48. Kyllonen, L.E., Salmela, K.T. (2006). "Early cyclosporine C0 and C2 monitoring in de novo kidney transplant patients: a prospective randomized single-center pilot study." *Transplantation*. 81: 1010-1015.
49. Zhang, X., Liu, Z.H., Zheng, J.M., Chen, Z.H., Tang, Z., Chen, J.S., et al. (2005). "Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation." *Clin Transplant*. 19: 638-643.
50. Sommerer, C., Meuer, S., Zeier, M., Giese, T. (2012). "Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression." *Clin Chim Acta*. 413: 1379-1386.
51. Hesselink, D.A., van, G.T., van Schaik, R.H. (2005). "The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression?" *Pharmacogenomics*. 6: 323-337.
52. Masuda, S., Inui, K. (2006). "An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients." *Pharmacol Ther*. 112: 184-198.
53. Spigset, O., Molden, E. (2008). "[Cytochrome P-450 3A4--the most important arena for drug interactions in the body]." *Tidsskr Nor Laegeforen*. 128: 2832-2835.
54. Elens, L., van, G.T., Hesselink, D.A., Haufroid, V., van Schaik, R.H. (2013). "CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy." *Pharmacogenomics*. 14: 47-62.
55. Elens, L., Bouamar, R., Hesselink, D.A., Haufroid, V., van, d.H., I, van, G.T., et al. (2011). "A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects

- tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients." *Clin Chem.* 57: 1574-1583.
56. de, J.H., Metalidis, C., Naesens, M., Lambrechts, D., Kuypers, D.R. (2011). "The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients." *Pharmacogenomics.* 12: 1281-1291.
 57. Klein, K., Thomas, M., Winter, S., Nussler, A.K., Niemi, M., Schwab, M., et al. (2012). "PPARA: a novel genetic determinant of CYP3A4 in vitro and in vivo." *Clin Pharmacol Ther.* 91: 1044-1052.
 58. Margreiter, R. (2002). "Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study." *Lancet.* 359: 741-746.
 59. van Rossum, H.H., de Fijter, J.W., van, P.J. (2010). "Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives." *Ther Drug Monit.* 32: 3-10.
 60. Fukudo, M., Yano, I., Katsura, T., Ito, N., Yamamoto, S., Kamoto, T., et al. (2010). "A transient increase of calcineurin phosphatase activity in living-donor kidney transplant recipients with acute rejection." *Drug Metab Pharmacokinet.* 25: 411-417.
 61. Stein, C.M., Murray, J.J., Wood, A.J. (1999). "Inhibition of stimulated interleukin-2 production in whole blood: a practical measure of cyclosporine effect." *Clin Chem.* 45: 1477-1484.
 62. Hartel, C., Schumacher, N., Fricke, L., Ebel, B., Kirchner, H., Muller-Steinhardt, M. (2004). "Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to tacrolimus (FK 506): impact of interleukin-2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect." *Clin Chem.* 50: 141-151.
 63. Barraclough, K.A., Staats, C.E., Isbel, N.M., McTaggart, S.J. (2010). "Review: Pharmacodynamic monitoring of immunosuppression in kidney transplantation." *Nephrology (Carlton).* 15: 522-532.
 64. Giese, T., Zeier, M., Schemmer, P., Uhl, W., Schoels, M., Dengler, T., et al. (2004). "Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A." *Transplantation.* 77: 339-344.
 65. Sommerer, C., Konstandin, M., Dengler, T., Schmidt, J., Meuer, S., Zeier, M., et al. (2006). "Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies." *Transplantation.* 82: 1280-1285.
 66. Sommerer, C., Hartschuh, W., Enk, A., Meuer, S., Zeier, M., Giese, T. (2008). "Pharmacodynamic immune monitoring of NFAT-regulated genes predicts skin cancer in elderly long-term renal transplant recipients." *Clin Transplant.* 22: 549-554.

67. Dannewitz, B., Kruck, E.M., Staehle, H.J., Eickholz, P., Giese, T., Meuer, S., et al. (2011). "Cyclosporine-induced gingival overgrowth correlates with NFAT-regulated gene expression: a pilot study." *J Clin Periodontol.* 38: 984-991.
68. Konstandin, M.H., Sommerer, C., Doesch, A., Zeier, M., Meuer, S.C., Katus, H.A., et al. (2007). "Pharmacodynamic cyclosporine A-monitoring: relation of gene expression in lymphocytes to cyclosporine blood levels in cardiac allograft recipients." *Transpl Int.* 20: 1036-1043.
69. Sommerer, C., Giese, T., Schmidt, J., Meuer, S., Zeier, M. (2008). "Ciclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression." *Transplantation.* 85: 15-21.
70. Giese, T., Sommerer, C., Zeier, M., Meuer, S. (2010). "Approaches towards individualized immune intervention." *Dig Dis.* 28: 45-50.
71. Sommerer, C., Zeier, M., Meuer, S., Giese, T. (2010). "Individualized monitoring of nuclear factor of activated T cells-regulated gene expression in FK506-treated kidney transplant recipients." *Transplantation.* 89: 1417-1423.
72. Sommerer, C., Zeier, M., Czock, D., Schnitzler, P., Meuer, S., Giese, T. (2011). "Pharmacodynamic disparities in tacrolimus-treated patients developing cytomegalus virus viremia." *Ther Drug Monit.* 33: 373-379.
73. Zahn, A., Schott, N., Hinz, U., Stremmel, W., Schmidt, J., Ganten, T., et al. (2011). "Immunomonitoring of nuclear factor of activated T cells-regulated gene expression: the first clinical trial in liver allograft recipients." *Liver Transpl.* 17: 466-473.
74. Chaudhri, G., Hunt, N.H., Clark, I.A., Ceredig, R. (1988). "Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin." *Cell Immunol.* 115: 204-213.
75. Lagoo, A., Tseng, C.K., Sell, S. (1990). "Molecular signals in B cell activation. I. Differential refractory effects of incomplete signaling by ionomycin or PMA relate to autocrine IL-2 production and IL-2R expression." *Cell Immunol.* 127: 483-496.
76. Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. (2007). "Real-time PCR determination of IMPDH1 and IMPDH2 expression in blood cells." *Clin Chem.* 53: 1023-1029.
77. Bremer, S., Vethe, N.T., Rootwelt, H., Bergan, S. (2009). "Expression of IMPDH1 is regulated in response to mycophenolate concentration." *Int Immunopharmacol.* 9: 173-180.
78. Stevens, L.A., Levey, A.S. (2005). "Measurement of kidney function." *Med Clin North Am.* 89: 457-473.
79. KDOQI Guidelines; Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification.
http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/toc.htm (Tilgjengelig 14.5.13 A.D.).

80. Ojo, A.O., Hanson, J.A., Wolfe, R.A., Leichtman, A.B., Agodoa, L.Y., Port, F.K. (2000). "Long-term survival in renal transplant recipients with graft function." *Kidney Int.* 57: 307-313.
81. Cole, E., Maham, N., Cardella, C., Cattran, D., Fenton, S., Hamel, J., et al. (2003). "Clinical benefits of neoral C2 monitoring in the long-term management of renal transplant recipients." *Transplantation.* 75: 2086-2090.
82. Pescovitz, M.D., Barbeito, R. (2002). "Two-hour post-dose cyclosporine level is a better predictor than trough level of acute rejection of renal allografts." *Clin Transplant.* 16: 378-382.
83. Scholten, E.M., Cremers, S.C., Schoemaker, R.C., Rowshani, A.T., van Kan, E.J., den, H.J., et al. (2005). "AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients." *Kidney Int.* 67: 2440-2447.
84. Wong, K.M., Shek, C.C., Chau, K.F., Li, C.S. (2000). "Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients." *Am J Kidney Dis.* 35: 660-666.
85. Cremers, S.C., Scholten, E.M., Schoemaker, R.C., Lentjes, E.G., Vermeij, P., Paul, L.C., et al. (2003). "A compartmental pharmacokinetic model of cyclosporin and its predictive performance after Bayesian estimation in kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients." *Nephrol Dial Transplant.* 18: 1201-1208.
86. Stefoni, S., Midtved, K., Cole, E., Thervet, E., Cockfield, S., Buchler, M., et al. (2005). "Efficacy and safety outcomes among de novo renal transplant recipients managed by C2 monitoring of cyclosporine a microemulsion: results of a 12-month, randomized, multicenter study." *Transplantation.* 79: 577-583.
87. Press, R.R., de Fijter, J.W., Guchelaar, H.J. (2010). "Individualizing calcineurin inhibitor therapy in renal transplantation--current limitations and perspectives." *Curr Pharm Des.* 16: 176-186.
88. Press, R.R., Ploeger, B.A., den, H.J., van der, S.T., van, P.J., Danhof, M., et al. (2009). "Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients." *Ther Drug Monit.* 31: 187-197.
89. Gruber, S.A., Hewitt, J.M., Sorenson, A.L., Barber, D.L., Bowers, L., Rynders, G., et al. (1994). "Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients awaiting renal transplantation." *J Clin Pharmacol.* 34: 859-864.
90. Undre, N.A., Schafer, A. (1998). "Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group." *Transplant Proc.* 30: 1261-1263.
91. Hu, R.H., Lee, P.H., Tsai, M.K. (2000). "Clinical influencing factors for daily dose, trough level, and relative clearance of tacrolimus in renal transplant recipients." *Transplant Proc.* 32: 1689-1692.

92. Christiaans, M., van, D.E., Beysens, T., Undre, N., Schafer, A., van, H.J. (1998). "Effect of breakfast on the oral bioavailability of tacrolimus and changes in pharmacokinetics at different times posttransplant in renal transplant recipients." *Transplant Proc.* 30: 1271-1273.
93. Kuypers, D.R., Claes, K., Evenepoel, P., Maes, B., Coosemans, W., Pirenne, J., et al. (2004). "Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients." *Clin Pharmacokinet.* 43: 741-762.
94. Mortensen, D.M., Koefoed-Nielsen, P.B., Jorgensen, K.A. (2006). "Calcineurin activity in tacrolimus-treated renal transplant patients early after and 5 years after transplantation." *Transplant Proc.* 38: 2651-2653.
95. Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vitko, S., Nashan, B., Gurkan, A., et al. (2007). "Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation." *N Engl J Med.* 357: 2562-2575.
96. De, R.A., Dierickx, D., Kuypers, D.R. (2011). "Tacrolimus-induced neutropenia in renal transplant recipients." *Clin J Am Soc Nephrol.* 6: 690-694.
97. Wadhawan, M., Gupta, S., Goyal, N., Vasudevan, K.R., Makki, K., Dawar, R., et al. (2012). "Cytomegalovirus infection: its incidence and management in cytomegalovirus-seropositive living related liver transplant recipients: a single-center experience." *Liver Transpl.* 18: 1448-1455.
98. Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., Nelson, J.A. (1997). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines." *J Clin Invest.* 100: 3154-3163.
99. Jiang, H., Kobayashi, M. (1999). "Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation." *Transplant Proc.* 31: 1978-1980.
100. Macphee, I.A. (2012). "Pharmacogenetic biomarkers: cytochrome P450 3A5." *Clin Chim Acta.* 413: 1312-1317.
101. Haufroid, V., Mourad, M., Van, K., 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.
102. Stratta, P., Quaglia, M., Cena, T., Antoniotti, R., Fenoglio, R., Menegotto, A., et al. (2012). "The interactions of age, sex, body mass index, genetics, and steroid weight-based doses on tacrolimus dosing requirement after adult kidney transplantation." *Eur J Clin Pharmacol.* 68: 671-680.
103. Demeule, M., Jodoin, J., Beaulieu, E., Brossard, M., Beliveau, R. (1999). "Dexamethasone modulation of multidrug transporters in normal tissues." *FEBS Lett.* 442: 208-214.

Vedlegg

Vedlegg 1 Mastermiks for targetgen

Mastermix IL2		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	2,8 µL	
Primer: IL2_F1 (20 uM)	0,5 µL	0,5 µM
Primer: IL2_R1 (20 uM)	0,75 µL	0,75 µM
Probe: IL2_FL1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probe: IL2_LC1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Mastermix IFNG		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	2,8 µL	
Primer: IFNG_F1 (20 uM)	0,5 µL	0,5 µM
Primer: IFNG_R1 (20 uM)	0,75 µL	0,75 µM
Probe: IFNG_FL1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probe: IFNG_LC1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Mastermix CSF2		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	2,5 µL	
Primer: CSF2_F1 (20 uM)	0,75 µL	0,75 µM
Primer: CSF2_R1 (20 uM)	0,75 µL	0,75 µM
Probe: CSF2_FL1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probe: CSF2_LC1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Vedlegg 2 Mastermiks for referanseggen

Mastermix ALAS		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	1,7 µL	
Primer: ALAS1 F1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Primer: ALAS1 R1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Probe: ALAS1 FL (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probe: ALAS1 LC (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Mastermix B2M		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	1,7 µL	
Primer: B2M F1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Primer: B2M R1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Probe: B2M FL (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probe: B2M LC (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Mastermix RPL13		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	1,7 µL	
Primer: L13 F1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Primer: L13 R1 (10 uM)	1,0 µL	0,5 µM
Probe: L13 FL (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probe: L13 LC (6 uM)	0,7 µL	0,2 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Vedlegg 3 Mastermiks for CYP3A5*1 og CYP3A4*22

Mastermix CYP3A5*1		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	2,6 µL	
CYP3A5-3_F5	0,1 µL	0,05 µM
CYP3A5-3_R4	0,3 µL	0,15 µM
CYP3A5-3_LC3	1,0 µL	0,15 µM
CYP3A5-3_LC4	1,0 µL	0,15 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	

Mastermix CYP3A4*22		
Reagenser	Volum per reaksjon	Endelig konsentrasjon
Vann	3,0 µL	
Primer: CYP3A4-22_F1 (20 uM)	0,3 µL	0,25 µM
Primer: CYP3A4-22_R1 (20 uM)	0,8 µL	0,75 µM
Probe: CYP3A4-22_LC1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probe: CYP3A4-22_FL1 (6 uM)	0,5 µL	0,15 µM
Probes Master (2Xconc)	10 µL	
Mastermix totalt	15 µL	
Prøve: cDNA	5 µL	
Totalt	20 µL	