

CYP3A-fenotype, målt som
4 β -hydroksykolesterol, hos pasienter før
og etter nyretransplantasjon

Ane Olastuen



Masteroppgave i farmakologi ved
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2015

CYP3A-fenotype, målt som 4 β -hydroksykolesterol, hos pasienter før og etter nyretransplantasjon

Masteroppgave i farmakologi for graden Master i farmasi ved
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet, Universitetet i Oslo

Oppgaven ble utført ved Senter for Psykofarmakologi
Diakonhjemmet sykehus, Oslo

Veiledere:

Professor II Espen Molden

Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Kristine Hole

Senter for Psykofarmakologi
Diakonhjemmet sykehus

Ane Olastuen

2015

© Ane Olastuen

2015

CYP3A-fenotype, målt som 4 β -hydroksykolesterol, hos pasienter før og etter
nyretransplantasjon

Ane Olastuen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forkortelser

4 β -OH-K	4 β -hydroksykolesterol
4 β -OH-K-d ₇	4 β -hydroksykolesterol-d ₇ (deuteriummerket internstandard)
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
C/D-ratio	dosejustert konsentrasjon
Cl _{kreatinin}	kreatininclearance
CRP	C-reaktivt protein
CYP	Cytokrom p-450
ESRD	end-stage renal disease
GFR	glomerulær filtrasjonshastighet (eng. glomerular filtration rate)
LC-MS/MS	væskrokromatografi med tandem massespektrometrisk deteksjon
LLOQ	laveste kvantifiseringsgrense (eng. lower limit of quantification)
Post-Tx	etter transplantasjon
Pre-Tx	før transplantasjon
TDM	terapeutisk legemiddelmonitorering (eng. therapeutic drug monitoring)
UPLC	ultra performance liquid chromatography

Sammendrag

Bakgrunn: Cytokrom P450 3A (CYP3A)-enzymer er de viktigste enzymene i metabolisme av legemidler. Det er vist stor intra- og interdividuell variasjon i CYP3A-fenotype og 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) er en aktuell endogen markør for denne variasjonen. Ved nedsatt nyrefunksjon er det tidligere rapportert at CYP3A-aktivitet reduseres. Hovedhensikten med dette masterprosjektet var å undersøke hvordan CYP3A-aktivitet, målt som 4 β -OH-K, endres etter nyretransplantasjon (post-Tx) sammenlignet med før transplantasjon (pre-Tx), og om relativ endring i fenotype eventuelt var knyttet til CYP3A4/5-genotype og nyrefunksjon pre-Tx.

Metode: Prosjektet tok utgangspunkt i plasmaprøver og dataregistreringer fra OPTIMAL-studien ved Oslo universitetssykehus, Rikshospitalet. I alt 36 nyretransplanterte pasienter med prøver pre-Tx og 1, 3, 5 og 7 uker post-Tx ble inkludert i prosjektet. Konsentrasjon av 4 β -OH-K ble analysert ved hjelp av en validert UPLC-APCI-MS/MS-metode ved Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus. Relevante opplysninger ble innhentet ved journalgjennomgang, C/D-ratio av takrolimus ble regnet ut, og kreatininclearance ble utregnet ved hjelp av Cockcroft-Gault-formelen. Pasientgruppen ble delt i subgrupper basert på genotyekombinasjon (genotyekombinasjonen *CYP3A4**1/*1 og *CYP3A5**3/*3 ble betraktet som kontrollgruppe) og på kreatininclearance pre-Tx. Statistiske sammenligninger mellom median 4 β -OH-K-konsentrasjon pre-Tx og ulike tidspunkter post-Tx hos pasientene ble gjort ved ikke-parametriske, to-halede Wilcoxon signed rank tester. Ikke-parametriske, to-halede Mann-Whitney tester ble brukt for å sammenligne 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom de ulike subgruppene ved samme prøvetidspunkt.

Resultater: Median plasmakonsentrasjon av 4 β -OH-K økte signifikant fra pre-Tx til uke 3 ($p=0,0037$), 5 ($p<0,0001$) og 7 ($p<0,001$) post-Tx. Pasienter med kreatininclearance <15 mL/min pre-Tx hadde en signifikant økning i 4 β -OH-K-konsentrasjon fra pre-Tx til post-Tx uke 3, 5 og 7 (alle $p<0,05$). Pasienter med kreatininclearance 15-30 mL/min hadde en signifikant økning fra pre-Tx til uke 5 og 7 post-Tx ($p<0,05$). Pasienter med kreatininclearance 30-60 mL/min viste ingen signifikant økning i 4 β -OH-K-konsentrasjon post-Tx (p =hhv. 0,38, 0,38, 0,063 og 0,055). Heterozygote bærere av *CYP3A5**1 hadde et signifikant høyere nivå av 4 β -OH-K-konsentrasjon enn kontrollgruppen pre-Tx og 1 uke post-Tx ($p<0,05$), men ingen signifikant forskjell fra og med 3 uker post-Tx ($p>0,2$).

Konklusjon: Denne studien viser at nedsatt CYP3A-aktivitet som følge av nyresykdom gjenvinnes relativt raskt etter transplantasjon. Den relative gjenvinningen er størst hos pasienter som ikke uttrykker CYP3A5 og/eller har lav kreatininclearance (<30 mL/min), dvs. subgrupper med lav CYP3A-aktivitet pre-Tx.

Forord

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder Espen Molden for god veiledning, faglige innspill og støtte under hele arbeidet med oppgaven, og for god hjelp under skriveprosessen.

Min veileder Kristine Hole fortjener også en stor takk for all hjelp på laboratoriet, god hjelp før og under skriveprosessen, korrekturlesning og evig godt humør. Jeg vil også takke Caroline Gjestad for all hjelp på laboratoriet, og ellers under hele oppgaven.

Jeg vil også takke Birgit Wollmann og Kristine Heitmann for et supert samarbeid, gode samtaler og hyggelige stunder under hele arbeidet med oppgaven.

Tusen takk til alle på Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus, for en flott tid sammen med dere. Jeg har lært utrolig mye og har hatt det veldig hyggelig hos dere.

Til slutt vil jeg takke Håkon, familie og venner for god støtte, forståelse og oppmuntring gjennom hele studietiden og særlig denne siste perioden.

Ane Olastuen

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Variasjon i legemiddelrespons.....	1
1.2	Cytokrom P450-systemet og CYP3A.....	2
1.2.1	CYP3A4.....	2
1.2.2	CYP3A5.....	3
1.3	Mulige markører for CYP3A-fenotype.....	3
1.3.1	4 β -Hydroksykolesterol.....	4
1.4	Nyrefunksjon og CYP3A-aktivitet.....	5
1.5	Nyretransplantasjon.....	6
1.6	Immunsuppresjon etter transplantasjon.....	7
1.7	Hensikt.....	8
2	Materiale og metode.....	9
2.1	Pasientmateriale.....	9
2.1.1	Journalgjennomgang.....	9
2.1.2	Inklusjon.....	9
2.2	Plasmakonsentrasjonsanalyse av 4 β -hydroksykolesterol.....	10
2.2.1	Prøveopparbeidelse.....	10
2.2.2	UPLC-APCI-MS/MS-analyse av 4 β -hydroksykolesterol.....	11
2.3	Målvariabler.....	14
2.4	Statistiske analyser.....	14
2.5	Etikk og godkjenninger.....	15
3	Resultater.....	16
3.1	Datamateriale.....	16
3.2	Plasmakonsentrasjon av 4 β -hydroksykolesterol pre- og post-Tx.....	17
3.2.1	Betydning av pre-Tx nyrefunksjon for post-Tx endring av 4 β -hydroksykolesterol.....	18
3.2.2	Betydning av genotype for 4 β -hydroksykolesterol.....	19
3.3	Sammenheng mellom dosejustert konsentrasjon av takrolimus og 4 β -hydroksykolesterol.....	21
3.3.1	Betydning av CYP3A4/5-genotype for variasjon i dosejustert konsentrasjon av takrolimus.....	23
4	Diskusjon.....	25

4.1	4 β -Hydroksykolesterol før og etter nyretransplantasjon	25
4.2	Sammenheng mellom 4 β -hydroksykolesterol og dosejustert konsentrasjon av takrolimus.....	28
4.3	Begrensninger ved studien.....	29
5	Konklusjon	31
	Litteraturliste	32
	Vedlegg	37

1 Innledning

1.1 Variasjon i legemiddelrespons

Individuell variasjon i legemiddelrespons er en utfordring i dagens praksis. Pasienter som tar samme dose av et legemiddel kan få ulik effekt av denne dosen. Det kan være ingen effekt, tilfredsstillende effekt eller bivirkninger/toksisitet (1, 2). Legemiddelbivirkninger er anslått å være årsak til 3-5 % av alle sykehusinnleggelser (3, 4). Den ulike effekten av samme dose legemiddel kan komme både av farmakokinetiske og farmakodynamiske forskjeller. Det kan være forskjeller mellom personer (interindividuelle forskjeller), og mellom forskjellige tidspunkt hos samme individ (intraindividuelle forskjeller) (5). Farmakokinetikk omfatter prosesser som sammen med dose bestemmer eksponering av legemidler og metabolitter, mens farmakodynamikk omfatter prosesser som styrer respons ved en gitt legemiddeleksponering (2).

Det er mange faktorer som kan være årsak til variasjon i legemiddelrespons, blant annet kjønn, alder, genetikk, sykdom, vekt, legemiddelbruk og miljø (5). Disse faktorene kan bidra til både farmakokinetisk og farmakodynamisk variasjon (1, 5). Konsentrasjonsmålinger i serum/plasma eller fullblod benyttes ofte som grunnlag for å studere farmakokinetisk variasjon av legemidler. Målinger av legemiddelkonsentrasjon i sirkulasjonen kan også brukes for å justere dosering som følge av farmakokinetisk variasjon. Sistnevnte, som betegnes terapeutisk legemiddelmonitorering (eng. therapeutic drug monitoring, TDM), omfatter i tillegg kontroll av etterlevelse (6).

Individuelle forskjeller i legemiddelmetabolisme anses som en av de viktigste årsakene til variasjon i legemiddelrespons. Legemiddelmetaboliserende enzymer er i all hovedsak lokalisert i lever, men også andre steder som i tarmveggen og i plasma (7).

Legemiddelmetabolisme deles overordnet inn i to reaksjonstyper (faser), henholdsvis fase I-reaksjoner (oksidasjon, reduksjon, hydrolyse) og fase II-reaksjoner (konjugeringsreaksjoner) (1, 7). Selv om fase I-reaksjoner normalt tilrettelegger for fase II-reaksjoner, kan noen legemidler gjennomgå fase II-reaksjoner uten forutgående fase I-metabolisme (for eksempel morfin og oksazepam) (7).

1.2 Cytokrom P450-systemet og CYP3A

Enzymer i cytokrom P-450 (CYP)-systemet er generelt de viktigste for fase I-reaksjoner (7). CYP-enzymene er en gruppe enzymer som er involvert i metabolisme av endogene stoffer og legemidler (8). Enzymene er hovedsakelig lokalisert i lever, men finnes også i andre organer, som for eksempel tarm (8). Det er identifisert flere enn 50 CYP-enzymene hos mennesker, men kun omtrent ti enzymer anses som viktige for legemiddelmetabolisme (8, 9). Blant disse enzymene er CYP3A, som metaboliserer omkring 50 % av alle legemidler, den viktigste gruppen CYP-enzymene (10).

Det er identifisert fire CYP3A-enzymene uttrykt hos mennesker: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43 (11-13). CYP3A4 og CYP3A5 er de viktigste isoformene for legemiddelmetabolisme (10). Disse to har lignende substratspesifisitet og omsetter mange av de samme legemidlene, men da ofte i ulik grad (10, 11, 14). De to andre isoformene, CYP3A7 og CYP3A43, er generelt av liten relevans for legemiddelmetabolisme. CYP3A7 er hovedsakelig uttrykt i lever ved fosterstadiet (11, 13, 15), mens CYP3A43 primært finnes lokalt uttrykt i prostata og testikler (11, 15).

1.2.1 CYP3A4

CYP3A4 regnes som det viktigste CYP-enzymet innen legemiddelmetabolisme, og er involvert i metabolismen av omtrent halvparten av alle legemidler (10, 16, 17). Enzymaktiviteten varierer i stor grad mellom ulike individer (10). Det er observert noen mutasjoner i CYP3A4-genet, men disse er sjeldne og har generelt liten innvirkning på enzymaktiviteten (10, 13, 17). Mutasjonen *CYP3A4*22* er imidlertid vist å redusere CYP3A4-aktivitet hos mennesker (14, 18). Økt konsentrasjon eller redusert dosebehov av mange CYP3A4-substrater er vist hos bærere av *CYP3A4*22*-allelvarianten. Eksempelvis viste en studie blant statinbehandlede pasienter med optimal lipidkontroll at tilstedeværelse av *CYP3A4*22* krevde en lavere dose statin enn hos pasienter uten *CYP3A4*22*-allelvariant (19). Det er også vist lavere dosebehov av takrolimus hos nyretransplanterte pasienter med tilstedeværelse av *CYP3A4*22* (20, 21). *CYP3A4*22*-allelfrekvensen er forholdsvis lav blant kauasiere (3-8 %) som begrenser påvirkningen på CYP3A4-variabilitet, men er likevel klinisk relevant for den delen av befolkningen som er bærere av allelet/genet (18).

1.2.2 CYP3A5

Mange CYP3A4-substrater metaboliseres også av CYP3A5 (10, 22). Enzymaktivitet av CYP3A5 er imidlertid tett knyttet til genetisk variasjon, og den vanligste allelvarianten blant kaukasiere er *CYP3A5*3* som koder for inaktiv enzymfunksjon. For store deler av den befolkningen spiller CYP3A5-enzymet derfor en mindre rolle for den totale CYP3A-aktiviteten, men kan være av betydning for enkeltindivider; det vil si *CYP3A5*1*-bærere, som uttrykker aktivt enzym. *CYP3A5*1* uttrykkes sjeldent hos kaukasiere (5-10 %), men har en mye hyppigere forekomst hos afrikanere (20-60 %) (10, 13, 15, 17, 22, 23).

Hos pasienter som uttrykker aktivt CYP3A5 kan dette enzymet bidra mye til den totale metabolismen av mange CYP3A-substrater, og da spesielt for legemidler med preferanse for metabolisme via CYP3A5 (13), som for eksempel takrolimus (13, 24). CYP3A5-genotype er vist å forklare 25-30 % av variasjonen i clearance av takrolimus (25), og *CYP3A5*1*-bærere har vist ca 50 % lavere dosejustert konsentrasjon (C/D-ratio) (26). Hjertetransplanterte pasienter med aktivt CYP3A5-enzym krevde ca 2,5 ganger høyere dose takrolimus enn pasienter som ikke uttrykker aktivt enzym (27).

1.3 Mulige markører for CYP3A-fenotype

Det er ikke alltid genotype predikerer fenotype, andre faktorer kan også innvirke. Derfor kan en markør som indikerer faktisk CYP3A4/5-aktivitet hos pasienter være nyttig for å tilpasse/optimalisere legemiddelbehandlingen (28). For eksempel er takrolimusdosering etter nyretransplantasjon avgjørende de første dagene etter transplantasjon for optimal immunsuppresjon (29). Ved hjelp av en CYP3A-fenotypemarkør vil farmakokinetikken til takrolimus kunne forutses og doseringen optimaliseres (20). En slik markør bør være et spesifikt substrat for enzymet, slik at den mengden metabolitt som dannes hovedsakelig skjer via aktuelt enzym og dermed reflekterer enzymaktiviteten (28).

Det er gjort flere studier på mulige markører for CYP3A4/5, med både endogene og eksogene substanser. Aktuelle eksogene markører omfatter midazolam, erytromycin og alprazolam, siden disse substansene metaboliseres hovedsakelig via CYP3A4/5 (16, 28, 30).

Midazolamclearance hos friske frivillige har lenge blitt brukt i legemiddelindustrien for å undersøke om nye legemidler potensielt hemmer eller induserer CYP3A (16).

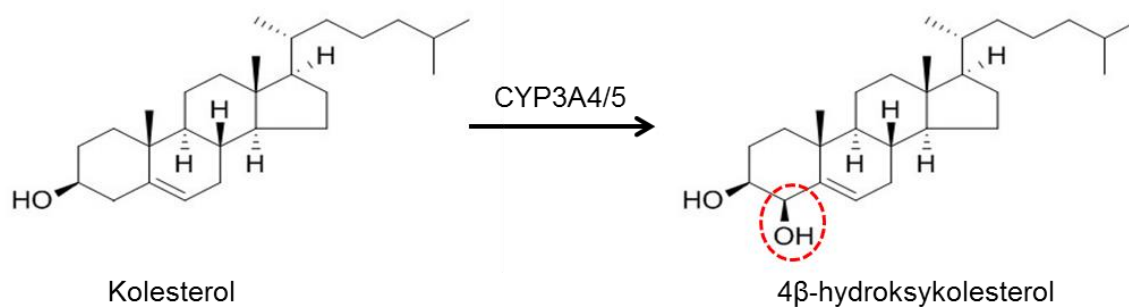
Farmakokinetikken til midazolam etter en oral dose har vist seg lineær ved store

doseforskjeller, og mikrodoser har vist å være tilstrekkelig for måling av total CYP3A-aktivitet (31). Det er imidlertid ønskelig med en endogen markør for å gjøre det praktisk enklere å måle fenotype samtidig som man unngår unødig legemiddeleksponering (16).

Kolesterolmetabolitten 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) og kortisolmetabolitten 6 β -hydroksykortisol dannes via nettopp CYP3A4/5 og er derfor aktuelle som endogene markører (32, 33). Deres potensiale som CYP3A-markører har blitt sammenlignet både med hverandre og med andre eksogene substanser i ulike studier (16, 17, 22, 34, 35). Begge substansene har vist endringer (i konsentrasjon eller metabolitt:kolesterol/kortisol-ratio) i tråd med endringer i konsentrasjon av substrat ved samtidig administrasjon av CYP3A4-hemmer eller induser (34, 35). 4 β -OH-K korrelerte også godt med CYP3A4-substrat uten samtidig administrering av induser (34). Kortisol og 6 β -hydroksykortisol skilles ut i urin og det er vist stor variasjon i kortisolsekresjon. For å bruke ratio 6 β -hydroksykortisol:kortisol som markør på CYP3A-aktivitet, bør urin samles i løpet av omtrent 12 timer, noe som gjør den mindre praktisk egnet enn 4 β -OH-K (35).

1.3.1 4 β -Hydroksykolesterol

I 2001 ble det publisert en studie som viste at pasienter behandlet med CYP3A-induserende antiepileptika (karbamazepin, fenobarbital, fenytoin) hadde flere ganger forhøyet nivå av 4 β -OH-K i plasma, og 4 β -OH-K ble dermed foreslått som en potensiell endogen markør på CYP3A-aktivitet (32). Det er også vist at CYP3A-hemmende behandling resulterte i signifikant lavere nivå 4 β -OH-K (36). 4 β -OH-K er et endogent oksysterol som dannes fra kolesterol via CYP3A4 og CYP3A5 (figur 1)(32). Det er vist at 4 β -OH-K ikke dannes via auto-oksidasjon av kolesterol (17, 32), og dermed er et spesifikt substrat for CYP3A4 og CYP3A5. 4 α -Hydroksykolesterol dannes også fra kolesterol, men konsentrasjonen av denne ble ikke påvirket av behandling som økte 4 β -OH-K-nivå (32). Dette tyder på at 4 α -hydroksykolesterol dannes via auto-oksidasjon av kolesterol og ikke via CYP3A4 og CYP3A5 (32).



Figur 1. Omdannelsen fra kolesterol til 4β-hydroksykolesterol (4β-OH-K) via CYP3A4/5.

Det er utført to studier som har undersøkt halveringstiden til 4β-OH-K. Den ene studien estimerte en halveringstid på 60 timer i friske frivillige etter intravenøs administrasjon av deuteriummerket 4β-OH-K (37). Denne halveringstiden representerer sannsynligvis heller distribusjonsfasen av deuteriummerket 4β-OH-K enn metabolisme og ekskresjon, da utregningene er basert på målinger gjort innen fem døgn etter administrasjon. En ny studie behandlet friske frivillige med rifampicin i to uker og målte 4β-OH-K-konsentrasjon ved flere tidspunkter i 8 uker etter behandlingsslutt. Ut fra de to siste målingene ble det estimert en halveringstid på 17 dager (38). Den lange halveringstiden til 4β-OH-K resulterer i at konsentrasjonen holdes stabil som er en fordel ved målinger i steady state-tilstander, men svekker 4β-OH-K som markør ved raske endringer i CYP3A-aktivitet (38).

Tidligere studier har brukt enten forhold mellom 4β-OH-K og kolesterol (4β-OH-K:kolesterol-ratio) eller 4β-OH-K alene som markør. Det er vist at kun 9 % av variasjonen i 4β-OH-K er forårsaket av variasjon i kolesterol, og at 4β-OH-K kan brukes som markør uten å korrigere for kolesterolnivå (22).

1.4 Nyrefunksjon og CYP3A-aktivitet

Det er vist at pasienter med nyresvikt (eng. end-stage renal disease, ESRD) har nedsatt CYP3A-aktivitet sammenlignet med friske frivillige basert på undersøkelse av såkalt «erytromycin-pusteprobe» (39). Begge pasientgruppene i studien viste lignende prosentvis økning i CYP3A-aktivitet etter seks dagers behandling med rifampicin (39). Tilsvarende har pasienter med akutt nyresykdom vist redusert metabolisme av midazolam sammenlignet med pasienter uten nedsatt nyrefunksjon (40). Økende alvorlighet og varighet av nyresykdommen har vist seg å være assosiert med større reduksjon i CYP3A-aktivitet (41).

Det kan være flere mulige årsaker til at nyresyke pasienter har nedsatt CYP3A-aktivitet. Inflammasjon er kjent å påvirke CYP3A-aktivitet (42, 43), og nyresyke pasienter har økte nivåer av flere inflammasjonsmarkører, blant annet C-reaktivt protein (CRP) (44, 45). Det er vist korrelasjon mellom CRP og markører på CYP3A-aktivitet i flere studier. Positiv korrelasjon er vist mellom CRP og metabolsk ratio av alprazolam og metabolitten 4-hydroksyalprazolam (alprazolam/4-hydroksyalprazolam) (30), og negativ korrelasjon mellom CRP og 4 β -OH-K (46). Disse funnene støtter at inflammasjonsstatus er av betydning for CYP3A-fenotype.

Ved nedsatt nyrefunksjon/nyresvikt vil uremiske substanser, som for eksempel urea og kreatinin, akkumuleres i sirkulasjonen. Noen av disse substansene (uremiske toksiner) er ansvarlige for toksisiteten som oppstår ved nyresvikt (47). En studie med inkubasjon av uremisk serum fra rotter med nyresvikt viste redusert CYP3A-aktivitet *in vitro*, som indikerer at uremiske substanser/toksiner kan være en årsak til nedsatt legemiddelmetabolisme (48). Den samme studien viste at reduksjonen i CYP3A-aktivitet var relatert til konsentrasjonen av uremisk serum (48). En studie som undersøkte ulike uremiske substanser og deres hemmende effekt på ulike CYP-enzymers aktivitet i humane hepatocytter rapporterte at tilstedeværelse av indoksylsulfat hemmet dannelsen av 6 β -hydroksyttestosteron fra testosteron (49), en omdannelse som skjer via CYP3A. At indoksylsulfat reduserer CYP3A-aktivitet (49), bekreftes i en *in vivo*-studie med nyresyke pasienter der det ble observert en negativ korrelasjon mellom indoksylsulfatkonsentrasjon og nivå av 4 β -OH-K (50). Det er videre vist at hemodialyse raskt bedrer CYP3A-aktiviteten (51, 52), som kan komme av at uremiske toksiner skilles ut ved dialyse.

I tråd med at nyresvikt nedsetter CYP3A-fenotype, har Suzuki *et al.* har vist en økning i plasmakonsentrasjon av 4 β -OH-K etter vellykkede nyretransplantasjoner (53, 54). Lite er imidlertid kjent omkring betydningen av CYP3A-genotype og nyrefunksjon før transplantasjon (pre-Tx) for økningen i CYP3A-aktivitet etter transplantasjon (post-Tx).

1.5 Nyretransplantasjon

For pasienter med terminal nyresvikt er nyretransplantasjon å foretrekke fremfor dialyse, men det forutsetter at pasienten tåler en transplantasjon og behandlingen i forbindelsen med denne (47, 55). Flere nyresyke pasienter er gamle og mange av disse har komplekse sykdommer som

vanskeligjør en transplantasjon (47). Selv om pasienter som søker transplantasjon bør ha estimert glomerulær filtrasjonshastighet (eGFR, eng. estimated glomerular filtration rate) $<15\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, er det økende fokus på grunnhelsen for best mulig langtidsprognose (56). I noen tilfeller gjennomføres det derfor transplantasjon ved bedre nyrefunksjon enn skissert over, nettopp for å unngå dialyse (56). Det er vist en sammenheng mellom kortere tid i dialyse og økende transplantat-/pasientoverlevelse etter nyretransplantasjon (57).

Pasientene følges nøye opp etter transplantasjon. Det tas prøver flere ganger i uken for blant annet å monitorere konsentrasjon av immundepende legemidler, og da ofte takrolimus som er foretrukket hos de fleste pasientene. Pasientene overføres til poliklinikken 8-12 dager etter transplantasjon, hvor de følges opp og kontrolleres fram til 10 uker etter transplantasjonen. Der kontrolleres de spesielt med fokus på postoperative komplikasjoner, graftfunksjon/rejeksjon og infeksjoner (56).

1.6 Immunsuppresjon etter transplantasjon

Nyretransplanterte pasienter er avhengig av livslang immunsuppressiv behandling for å forhindre avstøtning av den nye nyren (47). Standard immunsuppressivt behandlingsregime består av interleukin-2-reseptor-antistoff, inosinmonofosfatdehydrogenase(IMFD)-hemmer, kalsineurinhemmer og kortikosteroider (56). Interleukin-2-reseptor-antistoffet basiliksimab (monoklonalt antistoff) administreres intravenøst innen to timer pre-Tx og fire dager post-Tx (56). IMFD-hemmer mykofenolatmofetil doseres etter valg av kalsineurinhemmer (56), og har ingen påvirkning på farmakokinetikken til takrolimus (58).

Kalsineurinhemmeren takrolimus gis til alle nyretransplanterte pasienter med unntak av de med nedsatt glukosetoleranse, som gis ciklosporin. Takrolimus doseres med utgangspunkt i *CYP3A5*-genotype, hvor bærere av *CYP3A5*1* får dobbel dose sammenlignet med ikke-bærere (0,08 vs 0,04 mg/kg²). Hvis genotype er ukjent doseres pasienten som om vedkommende ikke uttrykker *CYP3A5*, dvs. bærer den vanligste genotypen (*CYP3A5*3/*3*). Bærere av *CYP3A4*22* har vist seg å ha et lavere dosebehov enn pasienter med *CYP3A4*1/*1* (25, 59). Takrolimus er et *CYP3A*-substrat som hovedsakelig metaboliseres i lever, men også i betydelig grad i tarmveggen. Metabolittene bidrar ikke til den immunsuppressive effekten av takrolimus (60). Takrolimus er også vist å være en hemmer av *CYP3A* (60, 61).

Kortikosteroider brukes også som en del av den immunsuppressive behandlingen. Intravenøs metylprednisolon gis på transplantasjonsdagen, og etter transplantasjonen gis peroral prednisolon i langsom nedtrapping frem til 12 måneder hvor det seponeres hos utvalgte pasienter (56). Ved tegn på reaksjon av transplantatet gis metylprednisolon intravenøst i fire dager etterfulgt av peroral prednisolon doseøkning til 30 mg ved behandling etter dag 4 i 14 dager. Dosen trappes ned hver 14.dag, og hvis mulig, ned til standard protokoll (56).

Flere studier har vist at dosejustert konsentrasjon (C/D-ratio) av takrolimus øker i tiden etter nyretransplantasjon (25, 62), og det har vært skissert ulike mulige årsaker til dette. CYP3A4-aktivitet, CYP3A5-genotype og hematokrit er faktorer som er vist å kunne påvirke clearance av takrolimus (25, 62). Siden CYP3A5-genotype er «konstant», er økende C/D-ratio av takrolimus post-Tx trolig knyttet til andre forhold. Det ble målt en redusert CYP3A4-aktivitet ved hjelp av redusert midazolamclearance (62), og på bakgrunn tidligere observert av steroidindusert CYP3A4-aktivitet (63, 64), ble nedtrapping av steroiddose lagt til grunn for denne reduksjonen (62). Hematokrit er en verdi som øker post-Tx grunnet gradvis økning i erythropoietin, som stimulerer syntese av røde blodceller (65). Siden konsentrasjonsbestemmelse av takrolimus skjer i fullblod, kan dermed gradvis økende hematokrit være en forklaring bak økt C/D-ratio av takrolimus i tiden etter nyretransplantasjon (25, 62, 66).

1.7 Hensikt

Tidligere studier har vist at CYP3A-aktivitet er redusert ved nedsatt nyrefunksjon (39, 41). Det er også vist at CYP3A-aktivitet, målt som 4 β -OH-K, bedres etter nyretransplantasjon, men da i et begrenset pasientmateriale (n=13) uten kjennskap til CYP3A-genotype (53).. Hvorvidt CYP3A-genotype og nyrefunksjon pre-Tx påvirker gjenvinning av CYP3A-aktiviteten er ukjent.

Hovedhensikten med dette masterprosjektet var å undersøke hvordan CYP3A-aktivitet, målt som 4 β -OH-K, endres etter nyretransplantasjon sammenlignet med før transplantasjon, og om relativ endring i fenotype var knyttet til CYP3A4/5-genotype og pre-Tx-nyrefunksjon. Sekundært var det også en målsetning å undersøke i hvilken grad 4 β -OH-K korrelerer med dosejustert konsentrasjon av takrolimus i tiden etter transplantasjon.

2 Materiale og metode

2.1 Pasientmateriale

Studien tok utgangspunkt i plasmaprøver fra OPTIMAL-studien ved Oslo universitetssykehus Rikshospitalet. OPTIMAL-studien inkluderte plasmaprøver fra 80 pasienter som gjennomgikk nyretransplantasjon mellom januar og juni 2014, og som deretter fikk immunosuppressivt behandlingsregime med takrolimus. Plasmaprøvene ble tatt pre-Tx og ved ulike tidspunkt post-Tx. Pasientene var også genotypet med hensyn til tilstedeværelse av *CYP3A5**3 (6986A>G) og *CYP3A4**22 (15389C>T). Analyser av takrolimuskonsentrasjon og genotype ble gjort på Rikshospitalet.

2.1.1 Journalgjennomgang

Pasientjournalene til alle pasientene ble gjennomgått på Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet for å hente ut relevant informasjon. Totalt ble det samlet journalinformasjon for 549 prøvetidspunkt. Informasjon om takrolimusedose og –konsentrasjon ved aktuelle prøvetidspunkter, kjønn, alder, vekt og eventuelle interagerende legemidler ble notert. I tillegg ble opplysninger om serumkreatininkonsentrasjon (s-kreatinin) hentet ut ved alle tidspunktene, og nyrefunksjon (kreatininclearance) ble estimert ved hjelp av Cockcroft-Gault-ligningen (67). Pasientnummer fra OPTIMAL-studien ble brukt for aidentifisering av pasientinformasjon på Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet før videre bruk i prosjektet ved Senter for Psykofarmakologi.

2.1.2 Inklusjon

Inntil 12 plasmaprøver fra ulike tidspunkt etter transplantasjon samt plasmaprøve før transplantasjon fra 63 av OPTIMAL-pasientene var tilgjengelige for analyse av 4β-OH-K. Etter journalgjennomgang ble det observert at flere av pasientene hadde prøver ved samme tidspunkt og tilgjengelig plasmaprøve ved fem utvalgte tidspunkt ble bestemt som inklusjonskriterie for prosjektet. Disse tidspunktene var pre-Tx, 1 (6-11 dager), 3 (20-25 dager), 5 (34-39 dager) og 7 (48-53 dager) uker post-Tx. Pasienter med CYP3A-interagerende behandling ble ikke ekskludert fra prosjektet.

2.2 Plasmakonsentrasjonsanalyse av 4 β -hydroksykolesterol

For å bestemme plasmakonsentrasjon av 4 β -OH-K ble det brukt en validert metode utviklet i et tidligere masterprosjekt ved Senter for Psykofarmakologi (68). På grunn av utfellingsreaksjoner etter reløsning av opparbeidede prøver, ble det i forbindelse med dette prosjektet gjort en modifisering fra den opprinnelige metoden. Det ble lagt til et trinn hvor prøvene etter reløsning ble overført til filtreringsrør for å filtrere vekk utfellinger før selve analysen.

2.2.1 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelsen var basert på væske-væske-ekstraksjon. Det ble pipettert ut 500 μ L plasmaprøve, som deretter ble tilsatt 50 μ L internstandard (10 μ M 4 β -hydroksykolesterol-d₇ i metanol) og 1 mL fersk 1 M natriummetoksidløsning i etanol. Blandingen ble ristet før den sto på benken i 20 minutter for fullstendig hydrolyse av esterbindinger mellom 4 β -OH-K og lange fettsyrer i plasma.

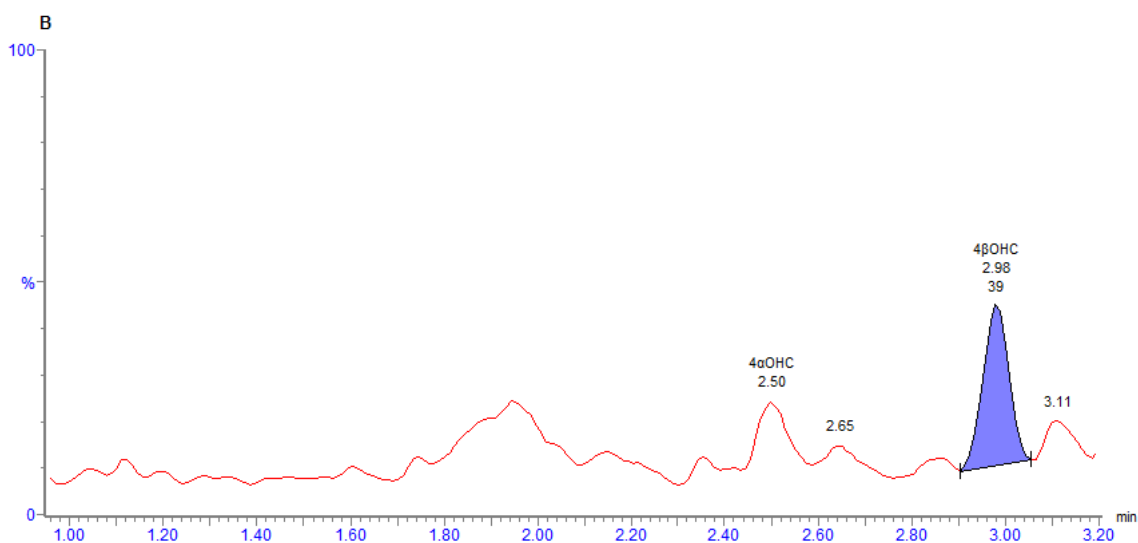
Deretter ble selve væske-væske-ekstraksjonen satt i gang. Den hydrolyserte prøven ble tilsatt 1 mL vann og 4 mL heksan, og blandingen ble vendt i to minutter for at 4 β -OH-K skulle ekstraheres fullstendig over i organisk fase. For å sikre fullstendig fase-separasjon mellom vandig og organisk fase ble blandingen sentrifugert ved 2500 omdreininger per minutt (rpm) i 5 minutter ved 20 °C. Etter sentrifugering ble blandingen satt i fryser ved -80 °C i 25 minutter for å fryse den vandige fasen, slik at den organiske fasen lett kunne helles rett over i nytt reagensrør. Den organiske fasen ble dampet inn til fullstendig tørrhet med lett nitrogengass-spray ved 37 °C, som tok ca 25 minutter. Inndampet prøve ble så reløst i 500 μ L metanol, blandet på vortexmikser og overført til små filterrør (Costar[®] Spin-x HPLC Micro Centrifuge Filter, 0,2 μ m Nylon Filter). For å maksimere utfellingsreaksjoner ble filterrørene plassert 15 minutter i fryser ved -20 °C før de ble sentrifugert ved 2500 rpm i 6 minutter ved 2 °C. De filtrerte ekstraktene ble overført til vialer og plassert i autosamler for analyse av 4 β -OH-K.

2.2.2 UPLC-APCI-MS/MS-analyse av 4 β -hydroksykolesterol

Til analyse av 4 β -OH-K i ekstraherte plasmaprøver ble det benyttet et væskrokromatografisystem av typen Aquility «ultra performance liquid chromatography» (UPLC) koblet til Micromass Quattro Micro tandem massespektrometrisk (MS/MS) detektor fra Waters (Milford, MA, USA). Kromatografisk separasjon av stoffene ble oppnådd ved bruk av en Aquility UPLC BEH Shield C18-kolonne (1,7 μ m, 1,0 x 100 mm; Waters). Injeksjonsvolumet var 10 μ L og kolonnetemperatur 40 °C. Mobilfasen besto av vann og metanol med gradienteluering fra forholdet 15:85 (tabell 1), og hastighet på mobilfasen var 0,150 mL/min. Disse betingelsene ga en analysetid per prøve på 10 minutter. Retensjonstiden til 4 β -OH-K var 3,0 minutter, mens den isomere formen 4 α -hydroksykolesterol, som ikke dannes via CYP3A (32), ble eluert etter 2,5 minutter (figur 2).

Tabell 1: Mobilfasesammensetning under UPLC-APCI-MS/MS-analysen

Tid (minutter)	Andel vann (%)	Andel metanol (%)
0	15	85
3,5	5	95
8,2	5	95
8,5	15	85
10	15	85



Figur 2. UPLC-APCI-MS/MS-kromatogram av en opparbeidet serumprøve som viser separasjon av 4β-hydroksykolesterol(4β-OH-K) og den isomere formen 4α-hydroksykolesterol.

Ionekilden mellom kolonnen og MS/MS-detektoren var en «atmospheric pressure chemical ionization» (APCI)-probe i positiv mode betingelser (spesifisert i tabell 2).

Tabell 2: Spesifikasjoner for APCI-probe inntilt i positiv mode ved bruk av MS/MS-detektor

Ionekildetemperatur	130 °C
Kapillærtemperatur	600 °C
Elektrisk spenning på corona-nålen	10 μA
Conegass	90 L/t
Nebulisatorgass	600 L/t

For deteksjon av 4β-OH-K og internstandard 4β-OH-K-d₇ ble følgende masseoverganger benyttet ved hjelp av multipel reaksjonsmonitorering (MRM) i MS/MS-detektoren:

- 4β-OH-K m/z 385,25 → 367,45
- 4β-OH-K-d₇ m/z 392,30 → 374,50

Programvaren MassLynx, versjon 4.1 (Waters, Milford, MA, USA), ble brukt for å bearbeide resultatene og bestemme topphøyde og retensjonstid til stoffene. Topphøyden til 4 β -OH-K ble justert for topphøyden til 4 β -OH-K-d₇ og brukt som responsvariabel i metoden.

Konsentrasjonen til 4 β -OH-K ble kalkulert ut fra en lineær standardkurve basert på åtte standardløsninger med konsentrasjoner av 4 β -OH-K i området 25-1600 nM.

Standardløsningene ble ikke laget i plasma, siden 4 β -OH-K er endogent, men besto av 4 β -OH-K og 4 β -OH-K-d₇ i metanol. Laveste konsentrasjon i standardkurven (25 nM) var også nedre kvantifiseringsgrense (eng. lower limit of quantification, LLOQ). Det ble injisert to paralleller fra hver vial og gjennomsnittet av 4 β -OH-K-konsentrasjonen til de to parallellene ble brukt videre.

Metoden var tidligere validert for nøyaktighet og presisjon med en intra- og interdag nøyaktighet <15 % ved 25 nM og <2 % ved 1600 nM, og presisjon <8 % ved 25 nM og <4 % ved 1600 nM (tabell 3) (68). Det ble analysert humane blankserumprøver med kjent konsentrasjon av 4 β -OH-K ved hver analyseserie. Disse blankserumprøvene var samlet serum fra mange pasienter og ble brukt som kontroll på variasjon innad i og mellom analyseseriene. Metoden ble ikke validert på nytt etter at filtreringstrinnet ble lagt til. Konsentrasjon av 4 β -OH-K i blankserumprøvene lå på samme nivå som de gjorde før endring i prosedyren, og det ble besluttet at en ny validering ikke var nødvendig.

Tabell 3. Intra- og interdag nøyaktighet- og presisjonsdata fra validering av UPLC-APCI-MS/MS-metoden for analyse av 4 β -hydroksykolesterol i serum ved henholdsvis lav (25 nM) og høy (1600 nM) konsentrasjon.

Konsentrasjon	Nøyaktighet (%)		Presisjon (%)	
	Intradag	Interdag	Intradag	Interdag
25 nM	6,9	14,2	5,2	8,1
1600 nM	1,4	0,2	1,4	3,7

Ved utvikling av metoden ble det vist at matrikseffekter ikke undertrykte responsen av analytten. Signal fra renstandardprøve i metanol og opparbeidede serumprøver med og uten tilsatt renstandard viste liten differanse, noe som indikerte at matrikseffekter ikke undertrykker responsen (68).

2.3 Målvariabler

Plasmakonsentrasjon av 4 β -OH-K ble brukt som mål på CYP3A-aktivitet. For å undersøke eventuell endring i CYP3A-aktivitet etter transplantasjon ble 4 β -OH-K-plasmakonsentrasjoner før transplantasjon (pre-Tx) sammenlignet med de ulike prøvetidspunktene etter transplantasjon (post-Tx) (1, 3, 5 og 7 uker).

For å undersøke hvorvidt nyrefunksjon pre-Tx var knyttet til endring av 4 β -OH-K-plasmakonsentrasjon post-Tx, ble pasientene delt i undergrupper basert på utregnet kreatininclearance pre-Tx. Skillet mellom gruppene ble satt ut fra glomerulær filtrasjonshastighet(GFR)-klassifiseringen nyresvikt (GFR<15mL/min), alvorlig nedsatt nyrefunksjon (GFR 15-30mL/min) og moderat nedsatt nyrefunksjon (GFR 30-60mL/min) (67).

Pasientene ble delt i undergrupper basert på CYP3A4- og CYP3A5-genotype for å undersøke om genotype hadde innvirkning på 4 β -OH-K-plasmakonsentrasjon. Pasienter uten tilstedeværelse av *CYP3A4*22* og *CYP3A5*1* ble ansett som referanse/kontrollgruppe (genotypekombinasjon *CYP3A4*1/*1* og *CYP3A5*3/*3*).

Dosejustert takrolimuskonsentrasjon (C/D-ratio) ble utregnet ved hvert prøvetidspunkt for å undersøke sammenhengen mellom 4 β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus i ukene post-Tx. C/D-ratio av takrolimus ble også sammenlignet i relasjon til CYP3A-genotype i de ulike ukene post-Tx.

2.4 Statistiske analyser

Statistikkprogrammet GraphPad Prism versjon 6 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) ble benyttet for statistiske analyser samt for grafisk fremstilling av data.

Plasmakonsentrasjoner av 4 β -OH-K hos pasientene pre- og post-Tx ble sammenlignet ved ikke-parametriske, to-halede Wilcoxon signed rank tester. Ikke-parametriske Kruskal-Wallis tester og ikke-parametriske, to-halede Mann-Whitney tester ble brukt for å sammenligne 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom de ulike subgruppene. Korrelasjonsanalyser mellom 4 β -OH-K og dosejustert konsentrasjon av takrolimus ble gjort ved ikke-parametriske, to-halede Spearmans' signed rank tester. P-verdier lavere enn 0,05 ble betraktet som statistisk signifikant.

2.5 Etikk og godkjenninger

OPTIMAL-studien var godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk og Statens Legemiddelverk (69). Denne godkjenningen gjaldt også for reanalyse av pasientprøver. Gjennomgang av journaler ble gjennomført på Oslo Universitetssykehus Rikshospitalet og informasjon ble aidentifisert med pasientnummer før videre bruk ved Senter for Psykofarmakologi.

3 Resultater

3.1 Datamateriale

Av de 63 tilgjengelige pasientene var det 37 pasienter med prøver innenfor alle gitte tidspunkt som ble inkludert videre i prosjektet. Etter gjennomgang av journaler ble det oppdaget at én av disse pasientene hadde tatt tidobbel dose med takrolimus før et av prøvetidspunktene og denne pasienten ble derfor ekskludert. Deskriptiv data over de 36 inkluderte pasientene er presentert i tabell 4. Ingen av pasientene var homozygote bærere av hverken *CYP3A4*22* eller *CYP3A5*1* (tabell 4). Før inklusjon i OPTIMAL-studien ble pasienter på legemidler som interagerer med takrolimusfarmakokinetikk ekskludert. Det ble funnet CYP3A-interagerende behandling hos seks av de inkluderte pasientene, men de ble tatt med i beregninger likevel. Utvikling i 4β-OH-K-nivå hos disse pasientene er fremstilt i vedlegg 1.

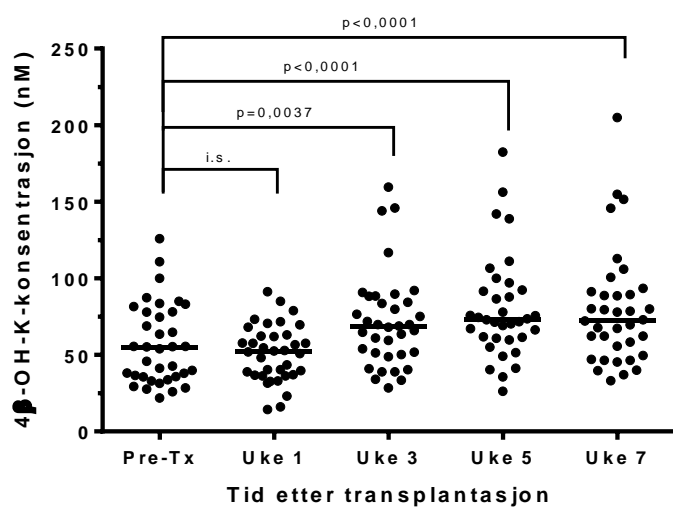
Tabell 4. Deskriptiv data for de inkluderte pasientene (n=36). Pre-Tx=før transplantasjon.

Kvinner, n (%)	11 (30,6)
Alder, median (spredning)	57 (24-75)
Kreatininclearance (mL/min), median (spredning)	
Pre-Tx	18,4 (5,5-40,9)
Uke 1	70,0 (13,7-123,2)
Uke 3	71,1 (18,0-116,1)
Uke 5	69,1 (27,9-126,0)
Uke 7	72,1 (26,9-114,2)
CYP3A4-genotype, n (%)	
*1/*1	32 (88,9)
*1/*22	4 (11,1)
*22/*22	-
CYP3A5-genotype, n (%)	
*1/*1	-
*1/*3	6 (16,7)
*3/*3	30 (83,3)
Kombinasjonsgenotype, n (%)	
<i>CYP3A4*1/*1</i> og <i>CYP3A5*1/*3</i>	6 (16,7)
<i>CYP3A4*1/*1</i> og <i>CYP3A5*3/*3</i>	26 (72,2)
<i>CYP3A4*1/*22</i> og <i>CYP3A5*3/*3</i>	4 (11,1)

3.2 Plasmakonsentrasjon av 4 β -hydroksykolesterol pre- og post-Tx

Fire av plasmaprøvene ble kvantifisert med 4 β -OH-K-konsentrasjoner lavere enn metodens LLOQ på 25 nM (14,4 – 23,1 nM). Tre av disse var prøver fra uke 1 og én var pre-Tx-prøve, ingen av prøvene var fra samme pasient. De ble likevel tatt med i beregninger. Én av plasmaprøvene fra uke 5 inneholdt ikke tilstrekkelig mengde plasma for å gjennomføre analysen, og er derfor ikke med i beregninger for det aktuelle prøvetidspunktet.

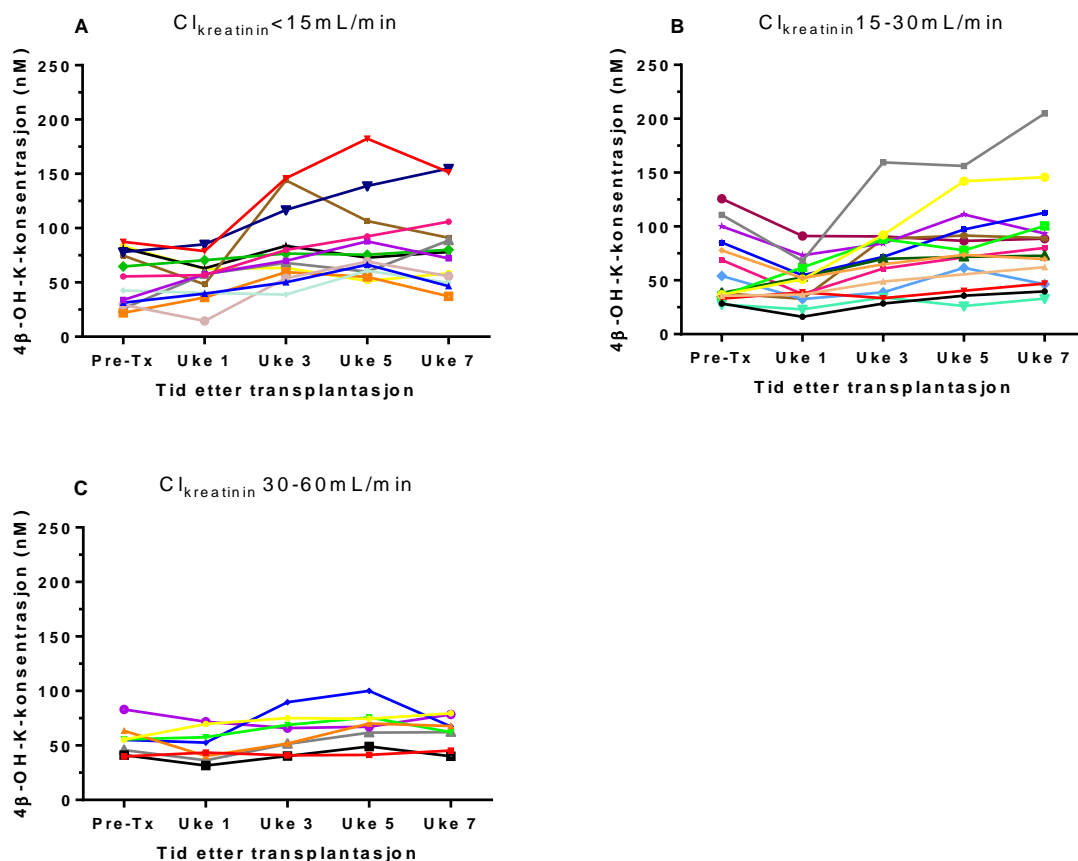
Median plasmakonsentrasjon av 4 β -OH-K var høyere i pre-Tx-prøvene (54,6 nM) enn i uke 1 post-Tx (52,3 nM), men forskjellen var ikke statistisk signifikant ($p=0,079$). Derimot var det en signifikant økning fra pre-Tx til 3 uker post-Tx (68,4 nM, $p<0,05$), og denne økningen var også signifikant i uke 5 (72,9 nM) og uke 7 (72,5 nM) i forhold til pre-Tx (begge $p<0,05$) (figur 3).



Figur 3: 4 β -hydroksykolesterol(4 β -OH-K)-konsentrasjon hos hele pasientgruppen målt før transplantasjon (pre-Tx) og ved ulike tidspunkt etter transplantasjon (n=36). I uke 5 er det kun 35 prøvesvar pga for lite tilgjengelig plasma i én prøve. Strek indikerer medianverdi. i.s. = ikke signifikant.

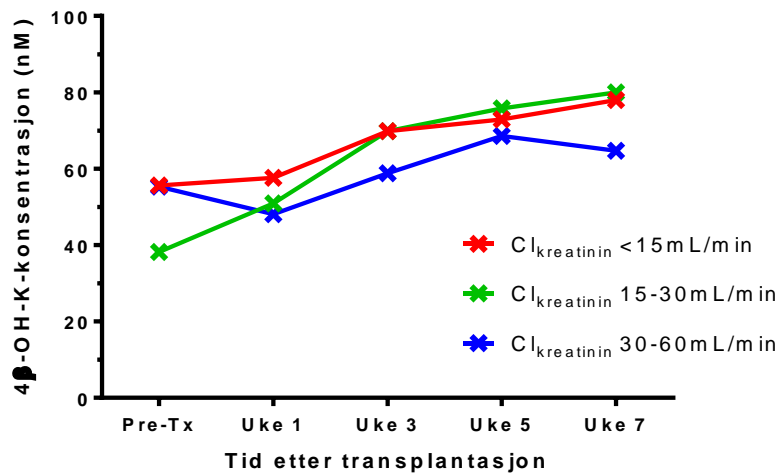
3.2.1 Betydning av pre-Tx nyrefunksjon for post-Tx endring av 4 β -hydroksykolesterol

Betydning av nyrefunksjon pre-Tx for utvikling av 4 β -OH-K-konsentrasjon post-Tx er fremstilt i figur 4. Pasienter med kreatininclearance <15 mL/min (n=13) viste en signifikant økning i 4 β -OH-K-konsentrasjon fra pre-Tx til uke 3, 5 og 7 (alle p<0,05). Pasienter med kreatininclearance 15-30mL/min (n=15) hadde også en signifikant økning i 4 β -OH-K-konsentrasjon fra pre-Tx til uke 5 og 7 post-Tx (p<0,05), mens 4 β -OH-K-konsentrasjoner hos pasienter med kreatininclearance 30-60 mL/min (n=8) ikke var signifikant forskjellig post-Tx sammenlignet med pre-Tx, hverken i uke 1 (p=0,38), uke 3 (p=0,38), uke 5 (p=0,063) eller uke 7 (p=0,055).



Figur 4. Utvikling av 4 β -hydroksykolesterol(4 β -OH-K)-konsentrasjon hos enkeltpasienter fra før og i ukene etter transplantasjon. Pasientene er delt inn etter nyrefunksjon før transplantasjon (pre-Tx). Figur A viser pasienter med kreatininclearance(Cl_{kreatinin}) <15 mL/min (n=13), figur B pasienter med kreatininclearance 15-30 mL/min (n=15), og figur C pasienter med kreatininclearance 30-60 mL/min (n=8). Hver linje representerer én pasient.

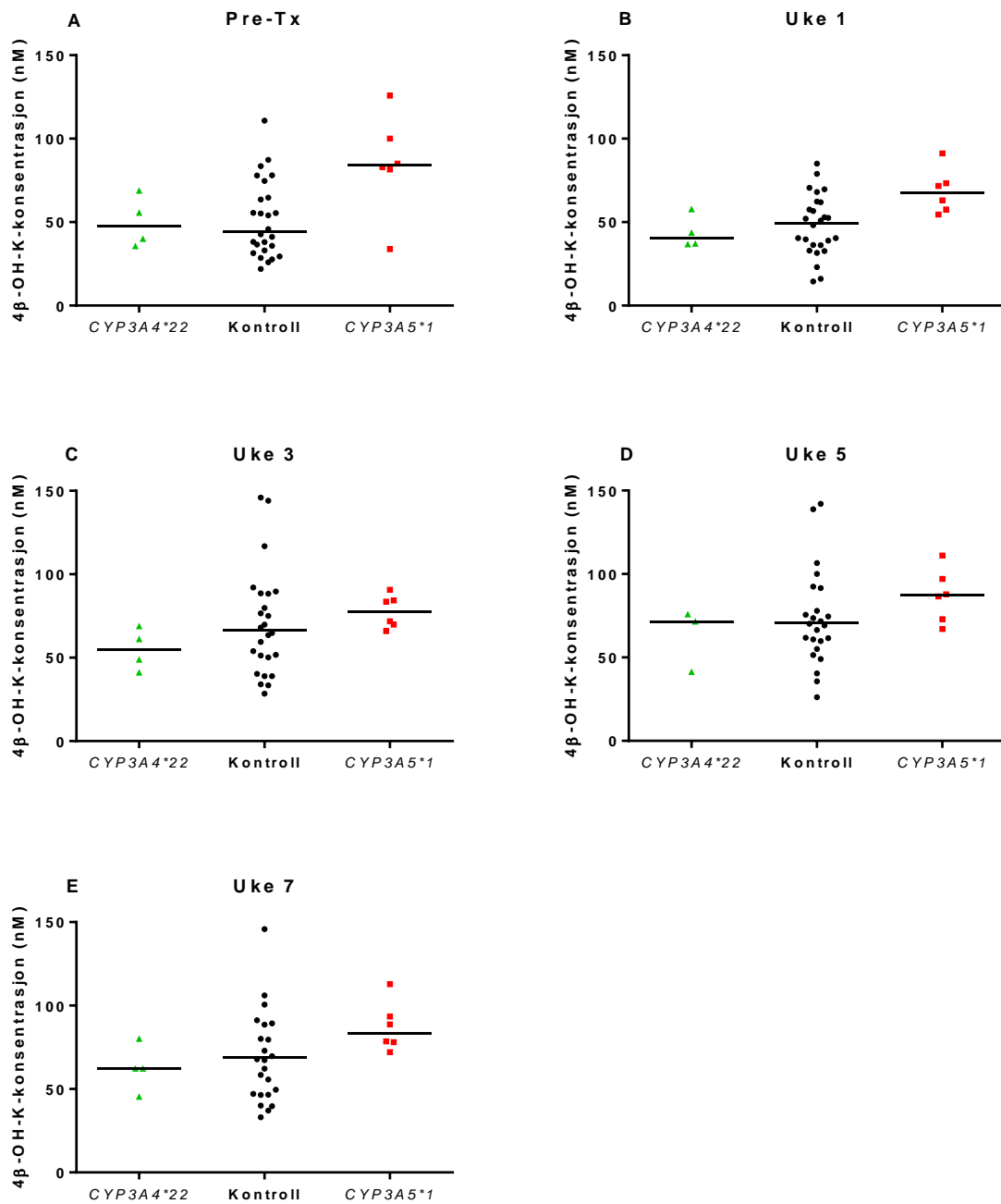
Det var ingen signifikant forskjell i 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom de ulike gruppene ved hvert prøvetidspunkt ($p>0,05$) (figur 5).



Figur 5. Utvikling av median 4 β -hydroksykolesterol(4 β -OH-K)-konsentrasjon over tid fordelt etter nyrefunksjon før transplantasjon (pre-Tx)(n=36).

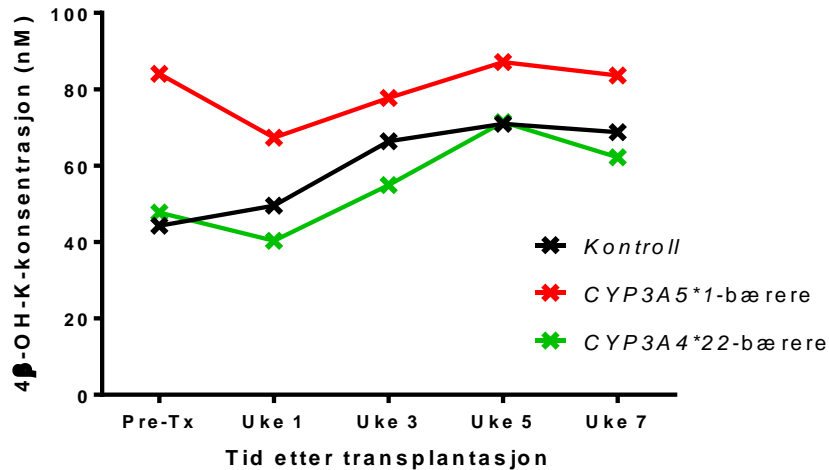
3.2.2 Betydning av genotype for 4 β -hydroksykolesterol

Heterozygote bærere av *CYP3A5*1* hadde et signifikant høyere nivå av 4 β -OH-K-konsentrasjon enn kontrollgruppen pre-Tx ($p=0,014$) og 1 uke post-Tx ($p=0,0088$), men det var ingen forskjell mellom gruppene ved de resterende tidspunktene post-Tx (figur 6). *CYP3A5*1*-bærere hadde en signifikant høyere 4 β -OH-K-konsentrasjon enn bærere av *CYP3A4*22* 1 og 3 uker post-Tx (henholdvis $p=0,038$ og $p=0,019$). Ved resten av tidspunktene var forskjellene ikke statistisk signifikante ($p>0,2$).



Figur 6. 4β-hydroksykoolesterol(4β-OH-K)-konsentrasjon ved hvert prøvetidspunkt fordelt etter CYP3A-genotype. Figur C, D og E har henholdsvis én, to og tre konsentrasjoner som ligger høyere enn figures område. Disse er alle i kontrollgruppen. Strek indikerer medianverdi. Kontroll = CYP3A4*1/*1 og CYP3A5*3/*3.

Pasienter i kontrollgruppen hadde en signifikant økning i 4β-OH-K-konsentrasjon 3, 5 og 7 uker post-Tx sammenlignet med pre-Tx (p<0,05, figur 7). *CYP3A4**22-bærere og *CYP3A5**1-bærere viste ingen signifikant endring i tiden post-Tx sammenlignet med pre-Tx (figur 7).



Figur 7. Utvikling i median 4β-hydroksykolesterol(4β-OH-K)-konsentrasjon over tid i alle tre genotypesubgruppene. Pre-Tx=før transplantasjon. Kontroll = *CYP3A4**1/*1 og *CYP3A5**3/*3.

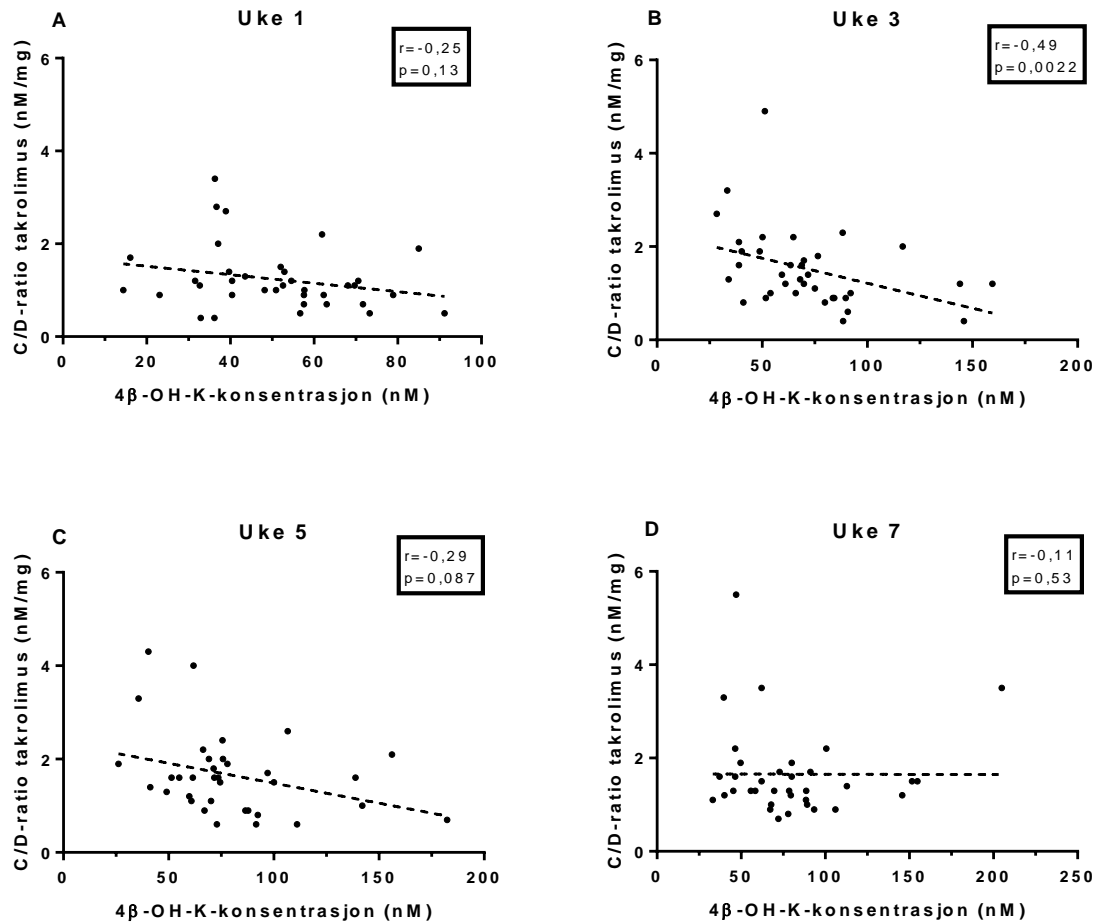
3.3 Sammenheng mellom dosejustert konsentrasjon av takrolimus og 4β-hydroksykolesterol

Pasientene hadde en gradvis, signifikant økning i dosejustert konsentrasjon av takrolimus i ukene etter transplantasjon sammenlignet med uke 1 (p<0,01) (tabell 5).

Tabell 5. Oversikt over takrolimusdata i hele pasientgruppen (n=36). C/D-ratio=dosejustert konsentrasjon.

Døgndose takrolimus (mg), median (spredning)	
Uke 1	5,0 (2,0-13,0)
Uke 3	5,0 (1,0-16,0)
Uke 5	4,0 (1,0-13,0)
Uke 7	4,0 (1,0-11,0)
C/D-ratio takrolimus, median (spredning)	
Uke 1	1,1 (0,4-3,4)
Uke 3	1,3 (0,4-4,9)
Uke 5	1,6 (0,6-4,3)
Uke 7	1,3 (0,7-5,5)

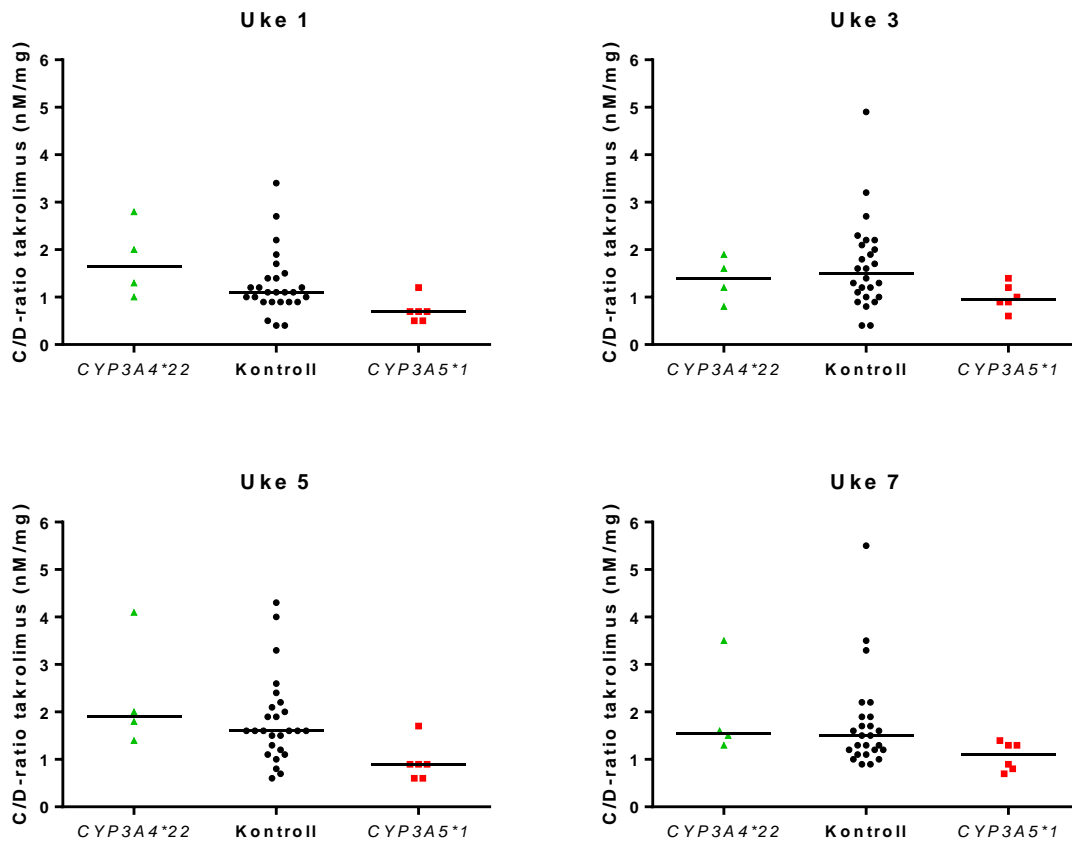
Sammenheng mellom dosejustert konsentrasjon og 4 β -OH-K-konsentrasjon av takrolimus er vist i figur 8. Det er en signifikant korrelasjon i uke 3 ($p < 0,05$, Spearmans $r = -0,4935$), men ikke ved de andre prøvetidspunktene ($p > 0,05$). I uke 7 mangler data fra én pasient siden konsentrasjonen av takrolimus ikke er kjent, og dermed er ikke C/D-ratio utregnet.



Figur 8: Spearmans korrelasjonsanalyse mellom dosejustert konsentrasjon av takrolimus (C/D-ratio) og 4 β -hydroksykolesterol(4 β -OH-K)-konsentrasjon (n=36) Det er lagt inn en lineær trendlinje for å visualisere sammenhengen. Uke 5 og 7 mangler hhv. 4 β -OH-K-konsentrasjon og C/D-ratio av takrolimus hos én pasient som dermed ikke er med i analysen ved disse tidspunktene (n=35).

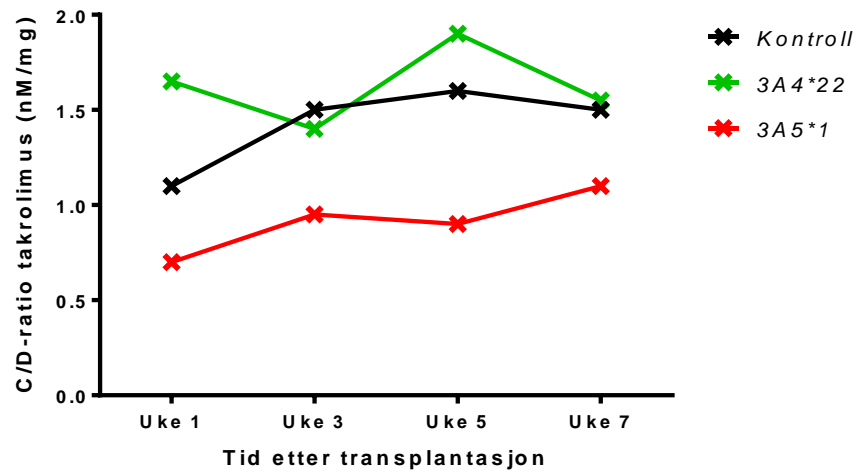
3.3.1 Betydning av CYP3A4/5-genotype for variasjon i dosejustert konsentrasjon av takrolimus

Observerert median C/D-ratio av takrolimus var 50 % høyere blant heterozygote bærere av *CYP3A4*22* (n=4) sammenlignet med kontrollgruppen i uke 1 post-Tx, men forskjellen var ikke statistisk signifikant ($p=0,14$) (figur 9).



Figur 9. Dosejustert konsentrasjon (C/D-ratio) av takrolimus hos genotypesubgruppene 1, 3, 5 og 7 uker etter transplantasjon.

Blant heterozygote bærere av *CYP3A5*1* (n=6) ble det observert en konsistent 30-40 % lavere C/D-ratio av takrolimus sammenlignet med kontrollgruppen gjennom de første ukene post-Tx (p<0,05) (figur 10).



Figur 10. Median dosejustert konsentrasjon (C/D-ratio) av takrolimus hos genotypesubgruppene i ukene etter nyretransplantasjon.

4 Diskusjon

Den endogene substansen 4 β -OH-K er potensiell markør for CYP3A-aktivitet på bakgrunn av at omdannelsen fra kolesterol til 4 β -OH-K hovedsakelig skjer via CYP3A4 og CYP3A5 (22, 32). Det er vist at 4 β -OH-K-konsentrasjon øker ved bruk av CYP3A-induserende behandling (32), og at 4 β -OH-K er sensitiv for CYP3A4-hemmende behandling (36). På grunn av sakte eliminasjon av 4 β -OH-K fra sirkulasjonen (lang halveringstid), antas det at farmakokinetikken til 4 β -OH-K ikke påvirkes av nyrefunksjon (37). Den er dermed en egnet markør for å undersøke CYP3A-aktivitet hos nyretransplanterte pasienter.

I dette prosjektet ble endring i CYP3A-aktivitet, målt som 4 β -OH-K, undersøkt pre-Tx og post-Tx hos nyretransplanterte pasienter behandlet med takrolimus. Det ble i hele pasientgruppen observert en signifikant økning i CYP3A-aktivitet fra pre-Tx til post-Tx (uke 3). Subgruppeanalyser indikerte videre at CYP3A4/5-genotype og kreatininclearance pre-Tx er av betydning for relativ endring i 4 β -OH-K-nivå post-Tx. Samsvaret mellom konsentrasjon av 4 β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus var varierende i ukene post-Tx, og sammenhengen var kun signifikant i uke 3 post-Tx.

4.1 4 β -Hydroksykolesterol før og etter nyretransplantasjon

Resultatene i dette prosjektet viser at konsentrasjon av 4 β -OH-K øker signifikant mellom pre-Tx og 3 uker post-Tx hos nyretransplanterte pasienter. Denne økningen var stabil og signifikant forskjellig fra pre-Tx også i uke 5 og 7 post-Tx, og viser dermed at redusert CYP3A-aktivitet grunnet nyresykdom gjenvinnes post-Tx. I en tidligere studie av Suzuki *et al.*, som også undersøkte nyrepasienter, var det en tendens til økning i 4 β -OH-K allerede fra tre dager post-Tx, men i denne studien var forskjellen fra pre-Tx først signifikant hele tre og seks måneder post-Tx (53). Prosentvis økning fra pre-Tx til tre og seks måneder var noe større i deres studie (ca 50 %) enn fra pre-Tx til uke 3 (25 %), 5 (34 %) og 7 (33 %) i våre resultater, men 4 β -OH-K-nivåene ligger generelt noe lavere både pre-Tx og post-Tx hos våre pasienter. Denne studien inkluderer flere pasienter enn Suzuki *et al.* som kan være en medvirkende årsak til at økningen er signifikant tidligere post-Tx i våre resultater. Uansett viser begge studiene at nedsatt CYP3A-aktivitet som følge av nyresykdom gjenvinnes post-Tx. De målte

4 β -OH-K-nivåene er sammenlignbare med tidligere rapporterte nivåer hos friske frivillige kaukasiere (22), og kan tyde på at CYP3A-aktivitet post-Tx blir helt normalisert.

Grunnen til at det ble observert en større gjenvinning av CYP3A-aktivitet tidligere i dette prosjektet sammenlignet med studien til Suzuki *et al.* er uklar, men en mulig årsak kan være at 4 β -OH-K-nivåene pre-Tx ligger lavere i vårt materiale sammenlignet med Suzuki *et al.*. Dette støttes av at subgruppene med den laveste CYP3A-aktiviteten pre-Tx i vårt materiale hadde den største prosentvise gjenvinningen. Pasientene med dårligst nyrefunksjon (kreatininclearance <30 mL/min) pre-Tx hadde en signifikant økning i 4 β -OH-K og CYP3A-aktivitet post-Tx, mens pasienter med høyere kreatininclearance (30-60 mL/min) pre-Tx ikke viste særlig økning i 4 β -OH-K post-Tx. Dette samsvarer med en tidligere publisert studie hvor det ble vist at økt alvorlighetsgrad av akutt nyresykdom ga en økt serumkonsentrasjon av midazolam og dermed nedsatt CYP3A-aktivitet (41). Det var imidlertid ikke noen signifikant forskjell i 4 β -OH-K-konsentrasjon mellom gruppene ved hvert prøvetidspunkt. I gruppen med kreatininclearance < 15 mL/min er det ingen bærere av *CYP3A4*22*. Dette styrker resultatet om at dårligere nyrefunksjon i seg selv påvirker CYP3A-aktivitet og ikke er avhengig av genotype.

I dette prosjektet ble det inkludert flere pasienter enn i studien til Suzuki *et al.*, som kan være en medvirkende faktor til at økningen er signifikant forskjellig allerede 3 uker post-Tx i vårt materiale i motsetning til den tidligere studien. Suzuki *et al.* spekulerer på om CYP3A-aktiviteten bedres tidligere i forløpet post-Tx enn deres resultater viste (53), og den signifikante økningen i 4 β -OH-K fra pre-Tx til 3 uker post-Tx hos våre pasienter bekrefter dette. Nivået av 4 β -OH-K som stabiliseres post-Tx hos våre pasienter, ligger på samme nivå som andre studier har vist i friske frivillige kaukasiere (22, 32). Pasientene i studien til Suzuki *et al.* stabiliseres på et høyere nivå som kan komme av at populasjonen har en større andel *CYP3A5*1*-bærere (44 %). Det er vist at 40-50 % asiater er bærere av allelvarianten *CYP3A5*1* (22). Gjennomsnittlig kreatininclearance pre-Tx i Suzukis studie ligger også noe lavere, og øker mindre post-Tx enn hos våre pasienter. Samlet sett gir dette sterke holdepunkter for at jo lavere CYP3A-aktiviteten er pre-Tx, jo større gjenvinning får man post-Tx.

Én mulig årsak til at nyresyke har nedsatt CYP3A-aktivitet er inflammasjonstilstanden som er sett hos nyresyke pasienter (44, 45). Det er i dialysepasienter vist en positiv korrelasjon mellom CRP og metabolsk ratio av alprazolam og metabolitten 4-hydroksyalprazolam, og

selv ved lav CRP er CYP3A-aktiviteten redusert målt som økt metabolsk ratio av alprazolam (30). En annen studie har vist en negativ korrelasjon mellom CRP og 4β-OH-K hos inflammasjonspasienter (46), som indikerer at 4β-OH-K kan brukes som markør for CYP3A-aktivitet hos denne pasientgruppen. I dette prosjektet ble det ikke målt CRP eller andre inflammasjonsmarkører, men en tidligere studie har vist at inflammasjonstilstanden hos nyretransplanterte forbedres post-Tx (45). Det er dermed grunnlag for å anta at det også var tilfellet hos pasientene som ble undersøkt i dette prosjektet.

Uremiske toksiner, som akkumuleres ved nedsatt nyrefunksjon, har også vist seg å være en mulig årsak til nedsatt CYP3A-aktivitet ved nyresykdom (48, 49). Grad av CYP3A-reduksjon er vist å være nært relatert til konsentrasjon av uremisk serum i rotter, altså konsentrasjon av uremiske substanser i serum (48). Dette er også vist i mennesker at økende konsentrasjon av indoksylsulfat, et uremisk toksin, har en signifikant negativ korrelasjon med 4β-OH-K (50). Flere studier har vist at hemodialyse, som senker konsentrasjon av uremiske substanser, øker CYP3A-aktivitet (51, 52). I denne studien øker kreatininclearance allerede 1 uke post-Tx, og dermed også utskillelsen av uremiske substanser, som styrker teorien om at økt konsentrasjon av uremiske substanser reduserer CYP3A-aktivitet.

Tidligere publiserte studier har vist at *CYP3A5*1*-bærere hadde en høyere 4β-OH-K-konsentrasjon enn de andre genotypesubgruppene (22, 23, 50, 54). Resultatene fra vårt prosjekt viste at *CYP3A5*1*-bærere hadde en høyere 4β-OH-K-konsentrasjon enn de andre genotypesubgruppene pre-Tx. Denne forskjellen ble imidlertid mindre i tiden post-Tx. Dette kommer av at 4β-OH-K-konsentrasjonen hos kontrollgruppen og *CYP3A4*22*-bærerne øker, men hos *CYP3A5*1*-bærerne er 4β-OH-K-konsentrasjonen stabil fra pre-Tx. CYP3A-aktiviteten hos *CYP3A5*1*-bærere ser ikke ut til å være påvirket av nedsatt nyrefunksjon pre-Tx, i motsetning til pasienter som ikke uttrykker CYP3A5. Dette støttes av Kirwan *et al.* som hevder at CYP3A-aktivitet ikke påvirkes negativt av nyresykdom blant *CYP3A5*1*-bærere. Deres påstand baserer seg på at metabolismen av midazolam er lite nedsatt hos nyresyke pasienter som uttrykker CYP3A5 (41).

Resultatene viser at genotype samsvarer med økende 4β-OH-K-konsentrasjon. *CYP3A4*22*-bærere har nedsatt CYP3A-aktivitet og lavest 4β-OH-K-konsentrasjon. Kontrollgruppen med normal CYP3A-aktivitet har noe høyere 4β-OH-K-konsentrasjon og *CYP3A5*1*-bærere med aktivt CYP3A5 har høyest 4β-OH-K-konsentrasjon. Dette samsvarer med tidligere publiserte

studier om at *CYP3A4**22 gir redusert CYP3A-aktivitet og *CYP3A5**1 gir økt CYP-aktivitet (19-21, 23, 26).

4.2 Sammenheng mellom 4 β -hydroksykolesterol og dosejustert konsentrasjon av takrolimus

En studie av de Jonge *et al.* har vist at CYP3A4-aktivitet, målt som clearance av midazolam, og CYP3A5-genotype samlet forklarer ca 60 % av variasjonen i farmakokinetikken til takrolimus hos nyretransplanterte pasienter (25). Hos subgruppen som ikke uttrykker CYP3A5 viste de at midazolamclearance forklarer ca 45 % av variasjonen i takrolimusclearance. Disse funnene baserer seg imidlertid på undersøkelser utført tre måneder post-Tx, og da i stabile pasienter.

I dette prosjektet ble korrelasjon mellom C/D-ratio av takrolimus og CYP3A-aktivitet, målt som 4 β -OH-K-konsentrasjon, undersøkt i de første ukene post-Tx. Mens det ikke var noen tendenser til sammenheng mellom konsentrasjon av 4 β -OH-K og takrolimus C/D-ratio i uke 1 post-Tx, var det en signifikant korrelasjon mellom konsentrasjon av 4 β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus i uke 3 post-Tx. Denne korrelasjonen ble dårligere ved 5 og 7 uker post-Tx.

Det er flere mulige årsaker til den varierende graden av samsvar mellom 4 β -OH-K-konsentrasjon og C/D-ratio av takrolimus den første tiden post-Tx. Manglende korrelasjon den første uken skyldes muligens at det vil ta en del tid før gjenvunnet CYP3A-fenotype manifesterer seg med et nytt stabilt nivå av 4 β -OH-K. Gitt at halveringstiden til 4 β -OH-K er 17 dager (38), vil det ta minst 17 dager (én halveringstid) før 4 β -OH-K-konsentrasjon nærmer seg ny likevektskonsentrasjon post-Tx. Dette kan forklare at korrelasjonen mellom de to variablene forbedres fra uke 1 til uke 3 post-Tx, og at korrelasjonen er signifikant ved sistnevnte tidspunkt.

At korrelasjonen mellom 4 β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus svekkes igjen etter uke 3, i uke 5 og 7 uker post-Tx, kan tyde på at senere enn 3 uker post-Tx er det noe annet enn CYP3A-aktivitet som påvirker C/D-ratio av takrolimus. Det er kjent at hematokritverdier øker post-Tx (66). Ettersom takrolimus har høy bindingsgrad til røde blodceller (blod:plasma-ratio ca 20:1) (60), øker også fullblodkonsentrasjonen av takrolimus post-Tx. Økning i takrolimus C/D-ratio som følge av økt hematokrit post-Tx, og dermed økt fordeling av takrolimus i blod, kan være en mulig årsak til at korrelasjonen mellom 4 β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus svekkes etter

uke 3 post-Tx. Et relevant moment når det gjelder økning i fullblodkonsentrasjonen av takrolimus er imidlertid at ubundet (terapeutisk aktiv) takrolimuskonsentrasjon ikke øker (66).

En annen potensiell årsak til at samsvaret mellom 4β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus svekkes etter uke 3 post-Tx er nedtrapping av steroiddose i tiden etter transplantasjon. Siden ulike kortikosteroider i varierende grad inducerer CYP3A-aktivitet (63, 64), kan en nedtrappingsdose gradvis bety mindre induksjon av CYP3A. Dette kan i så fall også forklare økt C/D-ratio av takrolimus i tiden etter transplantasjon. Siden 4β -OH-K har en lang halveringstid, kan nedtrapping av steroider etter uke 3 post-Tx muligens også forklare at korrelasjon mellom 4β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus svekkes i uke 5 og 7 post-Tx. Resultatene viser imidlertid en økning av 4β -OH-K post-Tx, som svekker denne teorien. Dette kan også muligens forklare at det ikke er korrelasjon mellom 4β -OH-K og C/D-ratio av takrolimus ved 5 og 7 uker post-Tx.

*CYP3A4*22* ser ut til å være assosiert med noe høyere C/D-ratio av takrolimus rett etter transplantasjon sammenlignet med kontrollgruppen, men denne forskjellen ser ut til å forsvinne over tid da C/D-ratio av takrolimus hos kontrollgruppen øker opp til samme nivå som *CYP3A4*22*-bærerne. En tidligere studie har i tråd med disse resultatene vist at *CYP3A4*22* er assosiert med økt C/D-ratio og redusert clearance av takrolimus (21). Subgruppen med *CYP3A4*22*-bærere består av veldig få pasienter, og det kan påvirke resultatet. Tilstedeværelse av *CYP3A5*1* er derimot assosiert med en stabil lavere C/D-ratio og dermed høyere dosebehov av takrolimus etter transplantasjon. Dette er godt kjent, og pasienter som med tilstedeværelse av *CYP3A5*1*-allel doseres høyere enn pasienter som ikke uttrykker CYP3A5 (56).

4.3 Begrensninger ved studien

Sammenlignet med tidligere studier som har undersøkt CYP3A-aktivitet før/etter nyretransplantasjon (53), er dette prosjektet mer omfattende i form av antall pasienter og supplerende opplysninger (genotyper etc.). Selv om dette bidrar til et relativt sterkt konklusjonsgrunnlag, har også datamaterialet i denne oppgaven noen begrensninger. Fire av prøvene ble blant annet kvantifisert lavere enn metodens LLOQ for 4β -OH-K og må ilegges noe mer usikkerhet enn det valideringsdataene tilsier. Det ble likevel valgt å inkludere disse prøvene i de statistiske beregningene, siden den målte 4β -OH-K-konsentrasjonen var <50 %

lavere enn LLOQ. På bakgrunn av dette og at disse prøvene kun utgjorde en liten andel av populasjonen, antas problemstillingen å ha liten betydning for det overordnede resultatet.

Et annet usikkerhetsmoment i datamaterialet, som representerer en problemstilling ved de fleste farmakokinetikkstudier, er etterlevelsen hos pasientene. Selv om immunsuppressiv behandling er nødvendig for å unngå organreaksjon, og pasientene antas å være motiverte for at behandlingen skal bli best mulig, er det ingen garanti for at de inntok forskrevet dose. Etterlevelse ble ikke kontrollert i studien, og er derfor et moment som kan ha bidratt til «støy» i korrelasjonsanalysene mellom 4 β -OH-K-konsentrasjon og takrolimus C/D-ratio.

I studiepopulasjonen var det totalt fire *CYP3A4**22-bærere og seks *CYP3A5**1-bærere. Sammenligningene av 4 β -OH-K-konsentrasjon post-Tx vs pre-Tx i disse subgruppene er derfor basert på et tynt grunnlag, og de statistiske resultatene må vurderes i lys av det. Samtidig virker det fornuftig at pasienter som allerede har nedsatt *CYP3A4*-metabolisme, inkludert *CYP3A4**22-bærere, er mindre følsomme for ytterlige faktorer som reduserer enzymaktivitet, mens det motsatte er tilfelle for pasienter som i utgangspunktet har økt *CYP3A*-metabolisme, for eksempel *CYP3A5**1-bærere.

Det er flere faktorer enn *CYP3A*-aktivitet som kan påvirke farmakokinetisk variabilitet av takrolimus. Vurdert i ettertid, er det ingen tvil om at det ville vært fordelaktig å innhente pasientenes hematokritverdier ved de ulike tidspunktene i forbindelse med journalgjennomgangene. Dette hadde åpnet muligheten for å undersøke om hematokrit-korrigerede C/D-ratioer av takrolimus korrelerer bedre med 4 β -OH-K –verdier enn ukorrigerede C/D-ratioer. Et annet moment som kunne ha vært undersøkt er i hvilken grad endring i 4 β -OH-K korrelerte med endring i nyrefunksjon.

5 Konklusjon

Denne studien viser at nedsatt CYP3A-aktivitet som følge av nyresykdom gjenvinnes relativt raskt etter transplantasjon. Den relative gjenvinningen er størst hos pasienter som ikke uttrykker CYP3A5 eller har lav kreatininclearance (<30 mL/min), dvs. subgrupper med lav CYP3A-aktivitet pre-Tx.

4 β -OH-K-konsentrasjon korrelerer til en viss grad med dosejustert fullblodkonsentrasjon av takrolimus, men i denne studien var sammenhengen mellom de to variablene bare signifikant i uke 3 post-Tx. Dette tyder på at variasjon i farmakokinetikk av takrolimus etter transplantasjon. En viktig faktor er trolig hematokritverdien, som øker gradvis etter transplantasjon. I framtidige studier bør derfor 4 β -OH-K-konsentrasjon inkluderes sammen med hematokrit og eventuelle andre aktuelle variable for å forklare farmakokinetisk variasjon av takrolimus, og da forslagsvis ved bruk farmakokinetisk modellering.

Litteraturliste

1. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine*. 2005;352(21):2211-21.
2. Rowland M, Tozer TN, Derendorf H, Hochhaus G. Chapter 1. Therapeutic Relevance. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications*. 4th ed. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 3-15.
3. Kongkaew C, Noyce PR, Ashcroft DM. Hospital admissions associated with adverse drug reactions: a systematic review of prospective observational studies. *The Annals of pharmacotherapy*. 2008;42(7):1017-25.
4. Bouvy JC, De Bruin ML, Koopmanschap MA. Epidemiology of adverse drug reactions in europe: a review of recent observational studies. *Drug Saf*. 2015;38(5):437-53.
5. Rowland M, Tozer TN, Derendorf H, Hochhaus G. Chapter 12. Variability. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications*. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 333-55.
6. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Kapittel 27. Bioanalyse av legemidler. *Legemiddelanalyse*. Bergen: Fagbokforl.; 2004. p. 449-85.
7. Spigset O, Slordal L. [Basic pharmacokinetics--elimination]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raecke*. 2005;125(9):1181-2.
8. Spigset O. [The cytochrome P-450 system]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raecke*. 2001;121(28):3296-8.
9. Goodman LS, Gilman A, Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Chapter 1. Pharmacokinetics. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. editors, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird ; consulting editor, Alfred Goodman Gilman. ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3-29.
10. Spigset O, Molden E. [Cytochrome P-450 3A4--the most important arena for drug interactions in the body]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raecke*. 2008;128(24):2832-5.
11. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(8):883-91.
12. Hiemke C, Shams M. Phenotyping and genotyping of drug metabolism to guide pharmacotherapy in psychiatry. *Current drug delivery*. 2013;10(1):46-53.
13. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;138(1):103-41.
14. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics*. 2013;14(1):47-62.
15. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical pharmacokinetics*. 2006;45(1):13-31.
16. Bjorkhem-Bergman L, Backstrom T, Nylen H, Ronquist-Nii Y, Bredberg E, Andersson TB, et al. Comparison of endogenous 4beta-hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction by rifampicin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(8):1488-93.
17. Diczfalusy U, Nylen H, Elander P, Bertilsson L. 4beta-Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(2):183-9.

18. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Frontiers in genetics*. 2013;4:12.
19. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(4):274-86.
20. Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Therapeutic drug monitoring*. 2013;35(5):608-16.
21. de Jonge H, Elens L, de Loor H, van Schaik RH, Kuypers DR. The CYP3A4*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(2):144-52.
22. Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, et al. 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(3):201-8.
23. Gebeyehu E, Engidawork E, Bijnsdorp A, Aminy A, Diczfalusy U, Aklillu E. Sex and CYP3A5 genotype influence total CYP3A activity: high CYP3A activity and a unique distribution of CYP3A5 variant alleles in Ethiopians. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(2):130-7.
24. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):836-47.
25. de Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012;92(3):366-75.
26. Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, Mohebi B, Dahl M, Bergan S, et al. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(6):685-93.
27. Lesche D, Sigurdardottir V, Setoud R, Oberhansli M, Carrel T, Fiedler GM, et al. CYP3A5*3 and POR*28 genetic variants influence the required dose of tacrolimus in heart transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring*. 2014;36(6):710-5.
28. Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):187-216.
29. Staatz C, Taylor P, Tett S. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2001;16(9):1905-9.
30. Molanaei H, Stenvinkel P, Qureshi AR, Carrero JJ, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Metabolism of alprazolam (a marker of CYP3A4) in hemodialysis patients with persistent inflammation. *European journal of clinical pharmacology*. 2012;68(5):571-7.
31. Hohmann N, Kocheise F, Carls A, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. Midazolam microdose to determine systemic and pre-systemic metabolic CYP3A activity in humans. *British journal of clinical pharmacology*. 2015;79(2):278-85.
32. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broome U, Einarsson C, et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence

- for involvement of cytochrome p450 3A4. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38685-9.
33. Shin KH, Choi MH, Lim KS, Yu KS, Jang IJ, Cho JY. Evaluation of endogenous metabolic markers of hepatic CYP3A activity using metabolic profiling and midazolam clearance. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2013;94(5):601-9.
 34. Dutreix C, Lorenzo S, Wang Y. Comparison of two endogenous biomarkers of CYP3A4 activity in a drug-drug interaction study between midostaurin and rifampicin. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(8):915-20.
 35. Marde Arrhen Y, Nylen H, Lovgren-Sandblom A, Kanebratt KP, Wide K, Diczfalusy U. A comparison of 4beta-hydroxycholesterol : cholesterol and 6beta-hydroxycortisol : cortisol as markers of CYP3A4 induction. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75(6):1536-40.
 36. Lutjohann D, Marinova M, Schneider B, Oldenburg J, von Bergmann K, Bieber T, et al. 4beta-hydroxycholesterol as a marker of CYP3A4 inhibition in vivo - effects of itraconazole in man. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;47(12):709-15.
 37. Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, et al. Metabolism of 4 beta -hydroxycholesterol in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):31534-40.
 38. Diczfalusy U, Kanebratt KP, Bredberg E, Andersson TB, Bottiger Y, Bertilsson L. 4beta-hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;67(1):38-43.
 39. Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, Hanes DS, Light PD, Stackiewicz L, et al. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;73(5):427-34.
 40. Kirwan CJ, Lee T, Holt DW, Grounds RM, MacPhee IA, Philips BJ. Using midazolam to monitor changes in hepatic drug metabolism in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 2009;35(7):1271-5.
 41. Kirwan CJ, MacPhee IA, Lee T, Holt DW, Philips BJ. Acute kidney injury reduces the hepatic metabolism of midazolam in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 2012;38(1):76-84.
 42. Morgan ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;85(4):434-8.
 43. Harvey RD, Morgan ET. Cancer, inflammation, and therapy: effects on cytochrome p450-mediated drug metabolism and implications for novel immunotherapeutic agents. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;96(4):449-57.
 44. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(2):505-21.
 45. Gursu M, Celik K, Ozturk S, Turkmen A, Gorcin S, Kocak B, et al. Pentraxin 3 and C-reactive protein as inflammatory markers after a kidney transplant. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2014;12(4):295-9.
 46. Bjorkhem-Bergman L, Nylen H, Norlin AC, Lindh JD, Ekstrom L, Eliasson E, et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and the CYP3A biomarker 4beta-hydroxycholesterol in a high-dose vitamin D supplementation study. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(4):704-8.

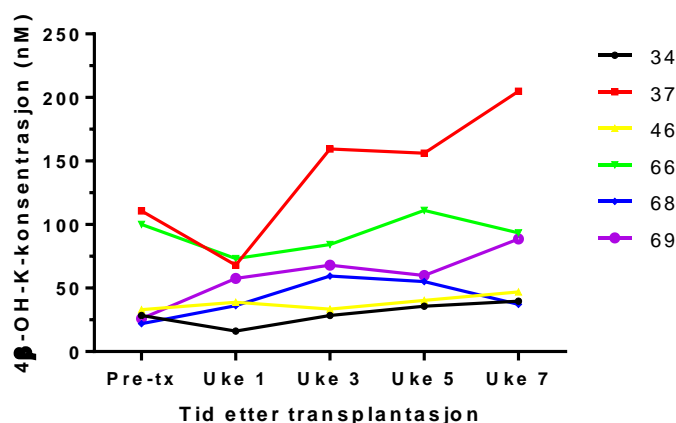
47. Walker R, Whittlesea C. Chapter 18. Chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Clinical pharmacy and therapeutics*. 5th ed. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier; 2012. p. 272-94.
48. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V. Down-regulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *British journal of pharmacology*. 2002;137(7):1039-46.
49. Hanada K, Ogawa R, Son K, Sasaki Y, Kikkawa A, Ichihara S, et al. Effects of indoxylsulfate on the in vitro hepatic metabolism of various compounds using human liver microsomes and hepatocytes. *Nephron Physiology*. 2006;103(4):p179-86.
50. Suzuki Y, Itoh H, Fujioka T, Sato F, Kawasaki K, Sato Y, et al. Association of plasma concentration of 4beta-hydroxycholesterol with CYP3A5 polymorphism and plasma concentration of indoxyl sulfate in stable kidney transplant recipients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(1):105-10.
51. Michaud J, Nolin TD, Naud J, Dani M, Lafrance JP, Leblond FA, et al. Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;108(2):157-63.
52. Nolin TD, Appiah K, Kendrick SA, Le P, McMonagle E, Himmelfarb J. Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(9):2363-7.
53. Suzuki Y, Itoh H, Sato F, Kawasaki K, Sato Y, Fujioka T, et al. Significant increase in plasma 4beta-hydroxycholesterol concentration in patients after kidney transplantation. *Journal of lipid research*. 2013;54(9):2568-72.
54. Suzuki Y, Fujioka T, Sato F, Matsumoto K, Muraya N, Tanaka R, et al. CYP3A5 polymorphism affects the increase in CYP3A activity after living kidney transplantation in patients with end stage renal disease. *British journal of clinical pharmacology*. 2015:n/a-n/a.
55. Næss O. Kapittel 11. Sykdommer i urinveier og nyrer. *Sykdomslære og patologisk anatomi*. 6. utg. ed. Høvik: Vett & Viten; 2012. p. 142-54.
56. Norsk nyremedisinsk forening. Protokoll for nyre-, pancreas- og øycelle-transplantasjon 2015 [14.10.2015]. Available from: <http://www.nephro.no/foreningsnytt/Tx-Protokoll-2015.pdf>.
57. Jørgensen PF. Nyretransplantasjon - kirurgisk perpektiv. *Kirurggen*. 2011(3):154-8.
58. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) CellCept: Statens legemiddelverk; [15.11.2015]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/no_NO/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000082/WC500021864.pdf.
59. Bruckmueller H, Werk AN, Renders L, Feldkamp T, Tepel M, Borst C, et al. Which Genetic Determinants Should be Considered for Tacrolimus Dose Optimization in Kidney Transplantation? A Combined Analysis of Genes Affecting the CYP3A Locus. *Therapeutic drug monitoring*. 2015;37(3):288-95.
60. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Prograf: Statens legemiddelverk; [15.10.2015]. Available from: <http://legemiddelverket.no/layouts/Preparatomtaler/SpC/1997-03113.pdf?id=04112015082114>.
61. Amundsen R, Asberg A, Ohm IK, Christensen H. Cyclosporine A- and tacrolimus-mediated inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 in vitro. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40(4):655-61.
62. de Jonge H, Vanhove T, de Loo H, Verbeke K, Kuypers DR. Progressive decline in tacrolimus clearance after renal transplantation is partially explained by decreasing CYP3A4 activity and increasing haematocrit. *British journal of clinical pharmacology*. 2015;80(3):548-59.

63. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2012;27(6):653-7.
64. Roberts PJ, Rollins KD, Kashuba AD, Paine MF, Nelsen AC, Williams EE, et al. The influence of CYP3A5 genotype on dexamethasone induction of CYP3A activity in African Americans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(8):1465-9.
65. Malyszko J, Oberbauer R, Watschinger B. Anemia and erythrocytosis in patients after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2012;25(10):1013-23.
66. Storset E, Holford N, Midtvedt K, Bremer S, Bergan S, Asberg A. Importance of hematocrit for a tacrolimus target concentration strategy. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(1):65-77.
67. Rowland M, Tozer TN, Derendorf H, Hochhaus G. Chapter 15. Disease. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications*. 4th ed. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 403-44.
68. Huynh DK. Utvikling av analysemetode for måling av 4 β -hydroksykolesterol og undersøkelse av 4 β -hydroksykolesterol som biomarkør for CYP3A4-fenotype i kliniske materialer [Masteroppgave]. Oslo: Universitetet i Oslo; 2014.
69. Storset E, Asberg A, Skauby M, Neely M, Bergan S, Bremer S, et al. Improved Tacrolimus Target Concentration Achievement Using Computerized Dosing in Renal Transplant Recipients-A Prospective, Randomized Study. *Transplantation*. 2015;99(10):2158-66.

Vedlegg

Komedikasjon

Seks pasienter gikk på legemidler som inducerer eller hemmer CYP3A4-aktivitet (figur 11). To av disse pasientene brukte CYP3A4-hemmer (amiodaron/verapamil) før og under hele perioden etter transplantasjon. Én pasient brukte diltiazem (CYP3A4-hemmer) før transplantasjon, men det ble seponert på transplantasjonsdagen. Denne pasienten fikk også metylprednisolon-behandling, som kan inducere CYP3A (62), i løpet av ukene etter transplantasjon. Tre andre pasienter fikk også behandling med metylprednisolon i løpet av ukene etter transplantasjon.



Figur 11: Utvikling av 4 β -hydroksykolesterol(4 β -OH-K)-konsentrasjonsnivå før og ved ulike tidspunkt etter transplantasjon hos pasienter komedisinert med hemmere eller inducere av CYP3A4 (n=6).
Pasient 34 og 46 fikk CYP3A4-hemmer (hhv. amiodaron og verapamil).
Pasient 37 fikk CYP3A4-induser (metylprednisolon) etter uke 1-prøven og i fem påfølgende dager.
Pasient 66 fikk CYP3A4-induser (metylprednisolon) etter uke 3-prøven og i fem påfølgende dager.
Pasient 68 fikk CYP3A4-induser (metylprednisolon) to dager før uke 1-prøven og i tre påfølgende dager.
Pasient 69 gikk på CYP3A4-hemmer (diltiazem) fram til transplantasjonsdagen, og fikk CYP3A4-induser (metylprednisolon) etter uke 1-prøven og fram til seks dager før uke 3-prøven.